

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ФГБУН Институт молекулярной
генетики РАН
Член-корреспондент РАН
Костров Сергей Викторович
11 ноября 2015 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной генетики Российской академии наук –
о диссертационной работе **Е. Е. Корболиной** на тему
**«ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ, С КОТОРЫМИ АССОЦИИИРОВАНО РАЗВИТИЕ
РАННИХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
У КРЫС OXYS, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНГЕННЫХ ЛИНИЙ»**,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07 - генетика

Актуальность исследования

Улучшение качества жизни в пожилом возрасте и снижение скорости старения являются важнейшими и приоритетными задачами современной биологии и медицины. Известно, что старение сопряжено с развитием различных нейродегенеративных заболеваний; возраст является одним из важнейших факторов риска появления старческих деменций, нарушений движения, зрения, слуха, обусловленных дегенерацией нейронов. Очевидно, что эффективное предупреждение и лечение этих заболеваний, замедление старения и продление жизни должны базироваться на глубоком понимании молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе патологий нервной системы. В связи с этим, как фундаментальные, так и прикладные научные исследования, проводимые в этой области, крайне востребованы и актуальны.

Одним из таких исследований, несомненно, является работа Е. Е. Корболиной. Спецификой нейродегенеративных заболеваний является поздняя манифестация их видимых признаков. Поиск методов, маркеров, позволяющих провести раннюю диагностику таких заболеваний – задача первостепенной важности, поскольку только в случае своевременного выявления болезни можно надеяться на эффективное лечение. В связи с этим изучение ранних нейродегенеративных изменений, а именно этой проблеме посвящена диссертация Е. Е. Корболиной, приобретает особую важность. Все виды наиболее распространенных нейродегенеративных патологий являются комплексными многофакторными полигенными заболеваниями, поэтому их исследование требует особых подходов, а каждая новая работа в этой области имеет особую ценность.

Научная новизна исследования

В последние годы для исследования молекулярно-генетических основ различных патологий всё большее использование находят модели болезней человека, созданные с использованием лабораторных животных. Модели позволяют более детально, чем это позволяет работа с человеком, исследовать причины возникновения и развития болезней

на молекулярном уровне, выявить особенности метаболизма на доклинических стадиях. Работа Е. Е. Корболиной основана на исследовании уникальной модельной линии крыс OXYS, полученной в Новосибирске и характеризующейся преждевременным старением. Это в значительной степени обуславливает оригинальность представленной автором диссертационной работы и ее особо ценный вклад в развитие генетики старения и старческих болезней. Исследование крыс OXYS проводится в течение многих лет, и предшественники соискателя получили и опубликовали множество ценных научных результатов. Оригинальность и принципиальная новизна данной диссертационной работы обусловлены тем, что автор сконцентрировался на исследовании генетического контроля ранних признаков нейродегенерации, которые в значительной мере оказались общими для традиционно исследуемой в лаборатории научного руководителя Е. Е. Корболиной, профессора Н. Г. Колосовой, ретинопатии и такого «классического» нейродегенеративного заболевания, как болезнь Альцгеймера.

Структура и содержание работы, достоверность и обоснованность научных результатов

Диссертация построена по стандартному плану. Во «Введении» традиционно описано современное состояние исследований в той области науки, в которой работает автор; перечислены проблемы, заслуживающие дальнейшего изучения, поставлены цели и задачи конкретного исследования, представленного в диссертационной работе; сформулированы основные положения, выносимые на защиту по результатам работы автора. Кроме того, и это не традиционно, во «Введении» приведены публикации соискателя по теме диссертации, позволяющие сразу составить впечатление о высоком уровне работы. Действительно, и количество публикаций – 12, и их качество – восемь работ опубликованы в международных журналах, в числе которых издания с солидным импакт-фактором, и еще четыре – в российских журналах – свидетельствуют о значимости, большом объеме и международном признании исследований Е. Е. Корболиной. Небольшое замечание касается ссылок на переводные российские журналы – они написаны на смеси русского и английского языков, а какому из изданий соответствует том и страницы, остается непонятным.

«Обзор литературы» представляет собой объемный (около 50 страниц), насыщенный информацией раздел диссертационной работы. Он состоит из семи очень толково написанных глав, в которых рассматривается различный материал, связанный с темой диссертации: современные представления об общих чертах и различиях в патогенетических механизмах развития нейродегенеративных заболеваний на примере болезни Альцгеймера (БА) и возрастной макулярной дегенерации (ВМД); исследования БА и ВМД на моделях животных; современные подходы к изучению механизмов развития нейродегенеративных заболеваний. Весьма интересна глава, в которой приводятся и рассматриваются имеющиеся данные о сходстве молекулярных механизмов развития БА и ВМД. Такое сходство указывает на существование базовых, универсальных механизмов развития нейродегенерации. Одна из глав посвящена рассмотрению методов выявления генов, связанных с генетическим контролем сложных признаков, в том числе болезней. Эта глава представляет большой интерес, поскольку в ней объединены и сравниваются самые разные подходы к задаче, часть из которых была использована и в работе соискателя. Сравняются достоинства и слабые стороны методов, рассматриваются

способы их коррекции недостатков методов при обработке результатов, что предваряет анализ собственных результатов соискателя. Возможно, что эту главу стоило бы поместить после глав, описывающих нейродегенеративные заболевания, чтобы не разбивать это описание. Все положения «Обзора литературы» подкреплены многочисленными ссылками на оригинальные работы различных авторов. Следует отметить, что библиография диссертационной работы беспрецедентно велика – список процитированной литературы содержит 742 названия.

Раздел «Материалы и методы» написан подробно, с указанием всех необходимых деталей использованных подходов. Научная проблема, исследованию которой посвящена диссертационная работа Е. Е. Корболиной, лежит на стыке нескольких областей науки: генетики, молекулярной биологии, физиологии, медицинской генетики. Для разработки этой проблемы автором работы был использован набор разнообразных современных методов. Такой комплексный подход к решению поставленных задач, безусловно, заслуживает высокой оценки. В Таблице 2 микросателлитные маркеры было бы удобнее представить по порядку расположения на хромосоме, в этом случае проще было бы оценить их равномерность и плотность, и выделить значимые маркеры, число которых оказалось небольшим. Непонятно, почему число использованных полиморфных маркеров различно при картировании и получении конгенных линий.

Результаты и обсуждение работы изложены в четырех главах.

В главе 3.1 сравнивается метаболическое состояние мозга рано стареющих крыс OXYS и контрольных крыс Wistar. Полученные данные позволяют автору прийти к принципиально важному заключению: в то время как появление признаков ускоренного старения мозга оказалось не связанным с нарушением энергетического метаболизма, развитие мозга крыс OXYS происходит на фоне характерных для адаптации к гипоксии изменений энергетического метаболизма – увеличения уровня креатинфосфата и его утилизации на синтез АТФ. Небольшое замечание к изложению материала можно разобрать на примере этой главы. В тексте диссертации подробно указаны выборки животных, использованные в различных экспериментах. Тем не менее, не всегда удается понять, каковы же эти выборки в каждом конкретном эксперименте. Например, на стр. 73 указана суммарная для двух линий и четырех возрастных групп выборка $n=48$. Таким образом, на каждый экспериментальный вариант приходится $48/8=6$ особей. При этом указано, что количество животных в каждой возрастной группе (для каждой линии? для обеих линий?) составляло от 5-ти до 12-ти. Значит ли это, что некоторые животные использовались в нескольких возрастах и возможно ли это, учитывая, что для исследования энергетического метаболизма необходимо было выделять мозг?

В главе 3.2 рассматриваются результаты картирования локусов, ответственных за некоторые признаки преждевременного старения, и получение конгенных линий с отдельными QTL, отвечающими за признаки ускоренного старения. Работы такого рода методически крайне сложны, требуют продолжительного времени, а потому представляют особую ценность. Однако в связи с использованной методологией картирования возникают следующие вопросы. Почему для картирования были использованы крысы WAG, а не Wistar, являющиеся предковыми (условно конгенными) по отношению к крысам OXYS? Их использование облегчило бы создание конгенных линий с интродуцированными

QTL. Почему выбрали микросателлитные маркеры? Ведь количество информативных маркеров оказалось маленьким. В связи с этим, почему маркеры не были проанализированы у исходных родительских линий? Возможно, тогда удалось бы найти более удобный вариант маркировки. Кроме того, тогда у гибридов понадобилось бы анализировать не все маркеры, а лишь те, по которым родительские линии различались. Не возникла бы необходимость говорить о том, что «нарушалось предположение» об аллелях маркеров у родительских линий (стр. 78).

В главе 3.3 рассмотрены фенотипические характеристики конгенных крыс. Впечатляет масштаб проведенной работы и разнообразие использованных методов, которые включают не только микроскопические исследования, поведенческие тесты, но и магнитно-резонансную томографию. Соискателю удалось охарактеризовать многочисленные признаки, касающиеся зрения и поведения конгенных особей и подтвердить, что ретинопатия и катаракта контролируются генами, локализованными в найденных QTL. Это чрезвычайно серьезный и важный этап картирования, который удалось успешно завершить.

Глава 3.4 посвящена анализу данных массового параллельного секвенирования транскриптома сетчатки крыс линии OXYS и конгенных линий. Первый принципиально важный результат этого анализа – уточнение картирования двух ранее выявленных QTL. При этом перенесенная часть QTL1 оказалась существенно меньшей, чем картированный QTL1. К сожалению, рисунок 13, иллюстрирующий этот важный результат, сложен для понимания по той причине, что районы хромосом на разных панелях рисунка расположены в различной ориентации. Проведенный на основе данных секвенирования транскриптомов поиск несинонимических замен в генах, входящих в два QTL, позволил выявить несколько полиморфных сайтов, отличающих рано стареющих крыс OXYS. Не вполне понятно, почему последовательности перенесенных QTL и соответствующих районов генома OXYS сравнивались с референсной последовательностью, а не с последовательностью генома WAG. Ведь именно на фоне генома WAG оценивали вклад QTL в изменение фенотипа. Тем не менее, полученные данные о генах-кандидатах и их полиморфных сайтах, связанных с контролем ускоренного старения, открывают широкие перспективы для дальнейшего исследования генетических основ старения и развития патологий глаза. В работе представлены также данные, указывающие на возможную роль двух генов крысы в контроле развития БА.

Исследование дифференциальной экспрессии генов в линиях с признаками раннего старения и патологии глаза по сравнению с контрольными линиями – важное направление работы, лежащее на острие современной молекулярной генетики. Дизайн эксперимента по исследованию дифференциальной экспрессии заслуживает обсуждения. Сравнение конгенных линий между собой позволяет выявить такие гены в пределах исследуемых QTL. Сравнение конгенных линий с линией OXYS позволяет выявить такие гены вне исследуемых QTL, то есть практически во всем геноме. Такая задача в контексте работы кажется слишком общей, ведь для ее решения проще сравнить родительские линии между собой. Результаты сравнения с OXYS для обеих конгенных линий должны быть сходными, поскольку их геном отличается только наличием-отсутствием одного из двух QTL. В то же время, для более детального исследования найденных QTL можно было бы сравнить транскриптомы конгенных линий и линии WAG. Однако в целом как сравнение конгенных

линий между собой, так и с линией OXYS вполне правомочно с точки зрения поиска генов, экспрессия которых определяет раннее старение. Полученные Е. Е. Корболиной данные представляют значительный интерес и особую ценность для фундаментальных исследований доклинических стадий заболеваний.

В целом экспериментальная часть диссертационной работы производит очень солидное впечатление. Объем, сложность и глубина проведенных исследований определили важность и новизну полученных результатов. Главы «Обсуждение результатов» и «Заключение» подводят итог проведенной работы. Хотелось бы особо отметить объем и основательность обсуждения результатов, что позволило соискателю удачно обобщить результаты проведенной работы.

Заключение о научно-практической ценности работы и соответствии её требованиям ВАК

Диссертационная работа Е. Е. Корболиной является законченным, актуальным, оригинальным, выполненным на высоком научном и методическом уровне исследованием. Работа имеет большую научную ценность: базируясь на анализе уникальной биологической модели, она проливает новый свет на генетические основы развития ранних признаков нейродегенерации. Результаты работы могут быть использованы в образовательных курсах по генетике, физиологии и нейробиологии, а также в научно-исследовательской работе Институтов и Университетов биологического и медицинского профиля. Работа имеет также большую практическую перспективу. Изменение транскрипции ряда генов, выявленное у молодых крыс с признаками патологии нервных клеток, можно рассматривать в плане использования для практических целей ранней диагностики нейродегенеративных заболеваний. Высказанные в отзыве критические замечания не снижают качество работы в целом.

Выводы работы адекватны полученным результатам, опубликованным в высокорейтинговых международных журналах и журналах из списка ВАК и представленным на различных научных конференциях. Содержание Автореферата хорошо соответствует содержанию диссертации. Тематика диссертации полностью соответствует специальности 03.02.07 – генетика. В целом работа соответствует требованиям ВАК и Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842 «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Е. Е. Корболина, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени.

Отзыв рассмотрен и одобрен на научном семинаре Отдела молекулярной генетики клетки ИМГ РАН 11 ноября 2015 года (протокол № 7).

Заведующий лабораторией геномной изменчивости
ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН (ИМГ РАН)
(Москва, пл. Академика И. В. Курчатова, д. 2; +7-499-1961909; egpas@img.ras.ru),
доктор биологических наук (специальность 03-00-15 – генетика),
профессор

Пасюкова Елена Генриховна