

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе В.С.Коростиной на тему «Изучение локализации и функциональной значимости белка Каизо в организме взрослых мышей», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Исследование эпигенетической регуляции экспрессии генов в норме и патологии – одно из наиболее динамично развивающихся направлений молекулярной генетики. Установлено, что нарушение метилирования ДНК и искажение других эпигенетических сигналов могут приводить к геномной нестабильности и нарушению экспрессии генов, преждевременному старению и таким заболеваниям, как рак, диабет, астма, различные тяжелые психические расстройства и многие другие. Несмотря на прогресс, достигнутый в понимании роли эпигенетического контроля генной экспрессии в биологических процессах, остается открытым целый ряд вопросов о механизмах реализации эпигенетической информации. В частности, очевидна неполнота знаний механизмов функционирования метил-ДНК связывающих белков, которые «читают», а затем «интерпретируют» эпигенетические сигналы, обеспечивая связь между метилированием ДНК и модификациями гистонов. В связи с этим не вызывает сомнений **актуальность** исследования В.С.Коростиной, посвященного изучению локализации и функций представителя BTV/POZ семейства метил-ДНК-связывающих белков – белка Каизо. Диссертация В.С.Коростиной – новое звено в серии ярких работ, выполненных в лаборатории геномики и эпигеномики позвоночных ФГУ «Фундаментальные основы биотехнологии», руководитель которой Егор Борисович Прохорчук впервые охарактеризовавший белок Каизо. Работа основана на исследовании созданной в его лаборатории уникальной модели – мышах с генетическим нокаутом Каизо. Используя этих животных в качестве отрицательного контроля, В.С.Коростина впервые провела детальный иммуногистохимический анализ экспрессии белка Каизо в клетках и тканях взрослых мышей – исследовала его локализацию во всех типах клеток кожи, репродуктивных органов, кишечника, тимуса, мозга и тканей глаза. Автор установила, что в эпителиальных тканях, нейронах и глиальных клетках различных структур мозга (коры, обонятельных луковиц, гиппокампа и мозжечка) и в репродуктивных органах белок Каизо экспрессируется в ядрах и только в фотосенсорных клетках сетчатки он детектируется в цитоплазме. Также впервые В.С.Коростина показала, что в репродуктивной системе половозрелых самцов мышей белок Каизо может служить маркером отдельных популяций сперматогониальных стволовых клеток, но при этом не экспрессируется в клетках Сертоли. Результаты этого раздела работы бесспорно оригинальны и имеют высокую **научно-**

практическую значимость. Они существенно расширяют представления о локализации белка Каизо в органах и тканях млекопитающих и послужат основой для дальнейших исследований механизмов функционирования этого и других метил-ДНК связывающих белков.

Несомненное теоретическое и практическое значение имеют результаты впервые выполненной В.С.Коростиной фенотипической характеристики мышей с генетическим нокаутом *Kaizo*. Классическими методами магниторезонансной томографии автор показала, что отсутствие гена *Kaizo* приводит к существенному изменению морфологических параметров головного мозга - уменьшению объема его боковых желудочков, указывающему на изменения в ликворной системе. Ликворная система играет важную роль в обеспечении обменных процессов в центральной нервной системе, в поддержании гомеостаза мозга, и выявленные изменения могут отражать дисбаланс между выработкой ликвора и его резорбцией, способный влиять на функции мозга. Возможно, с этим дисбалансом связаны вываленные автором изменения поведения и когнитивных функций нокаутных животных. Эти изменения В.С.Коростина установила в ходе комплексного исследования поведения мышей с генетическим нокаутом *Kaizo* с использованием солидного набора классических этологических тестов («свет/темнота», «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «новый объект», «принудительное плавание» и водный лабиринт Морриса). Диссертант впервые охарактеризовала моторно-исследовательское и депрессивно-подобное поведение нокаутных животных, их тревожность, способность к обучению и пространственную память. Ею установлен важный факт: при том, что нокаут *Kaizo* не влияет на жизненно важные функции, он существенно изменяет поведенческий стереотип животных и влияет на их когнитивные способности, значительно увеличивая двигательную активность мышей - как горизонтальную, моторную, так и вертикальную, которая традиционно рассматривается как исследовательская. Также в отсутствие гена *Kaizo* выросла способность ЦНС фильтровать сенсорную информацию, но при этом ухудшилась пространственная память животных, их способность к обучению в водном лабиринте Морриса. Если даже рассматривать изменения моторной активности (значительное увеличение количества вертикальных стоек в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт») как показатель высокой исследовательской активности, вряд ли можно его трактовать как позитивное изменение на фоне существенного снижения способности к обучению. Суммируя результаты исследования поведения животных во всем комплексе использованных в работе тестов, автор справедливо заключает, что в отсутствие Каизо мыши демонстрируют не просто повышенную двигательную активность, а

поведение, характерное для синдрома двигательной расторможенности у детей, одним из проявлений которого становится нарушение способности к обучению.

Очевидна научно-практическая ценность результатов, полученных автором в ходе выполнения третьей части работы, посвященной всестороннему исследованию влияния нокаута *Каизо* на развитие острого колита, вызванного декстран сульфатом натрия. В результате сравнения развития воспалительного процесса в кишечнике нокаутных мышей и мышей дикого типа на организменном, органном, тканевом, клеточном и молекулярном уровнях В.С.Коростиной впервые установлено, что отсутствие гена *Каизо* изменяет временные параметры развития острого воспаления в толстом кишечнике и существенно подавляет выраженность этого процесса. Однако в положениях, выносимых на защиту, диссертант ограничивается заключением о том, что отсутствие гена *Каизо* влияет только на проявление гистологических и морфологических признаков острого воспаления у мышей.

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, а также сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы представляет собой насыщенный информацией раздел диссертационной работы и не оставляет сомнений в компетентности автора, демонстрирует знание В.С.Коростиной как истории вопроса, так и самой современной литературы. Обзор состоит из 7 небольших разделов, в которых рассматриваются современные представления о механизмах эпигенетической регуляции генома, месте в ней процессов метилирования ДНК и участию в регуляции метилирования метил-ДНК связывающих белков. Закономерно, что особое внимание в обзоре уделено анализу значения этих процессов для развития и функционирования нервной системы и реализации воспалительного ответа организма. Все положения «Обзора литературы» подкреплены ссылками на оригинальные работы различных авторов. В то же время в обзоре литературы отсутствует обоснование цели и задач исследования, которое, как представляется, закономерно было бы вынести в заключение по этому разделу работы. Автор же ограничивается фразой о том, что «*Каизо* является важным объектом для изучения генетических, молекулярных и нейробиологических механизмов эпигенетической регуляции».

Раздел «Материалы и методы» написан подробно, с указанием всех необходимых деталей использованных подходов. Впечатляет количество и разнообразие методов и экспериментальных подходов, использованных в работе: от классических методов

гистологии и клеточной биологии до классических физиологических - поведенческого тестирования, методов магниторезонансной томографии и моделирования воспалительного процесса. Такой комплексный подход к решению поставленных задач определил достоверность полученных результатов и, безусловно, заслуживает высокой оценки.

Экспериментальная часть диссертационной работы в целом производит впечатление солидного фундаментального исследования. Прежде всего, это относится к разделу, посвященному исследованию локализации белка Каизо органах, тканях и клетках организма взрослых мышей. Полученные классическими методами иммуногистохимии результаты этого раздела работы убедительны, наглядны, а опубликованная по его материалам статья обречена на высокий уровень цитирования.

Как самостоятельный раздел выглядит исследование морфологических особенностей мозга мышей с нокаутом гена Каизо методами МРТ и следующая за ним глава, посвященная поведенческому фенотипированию этих животных. От оценки влияния нокаута на поведенческий стереотип и когнитивные функции мышей автор переходит к следующему, по сути, тоже самостоятельному разделу работы, посвященному исследованию особенностей течения в организме мышей с нокаутом *Каизо* острого колита, вызванного декстран сульфатом натрия. Комплексный подход с привлечением для оценки тяжести течения воспалительного процесса на уровне организма, можно полагать, традиционного клинического показателя - индекса активности колита, и классических гистоморфологических подходов, а также исследования про- и противовоспалительных цитокинов позволили В.С.Коростиной установить, что белок Каизо участвует в развитии острого воспаления в кишечнике в ответ на воздействие ДСН, а его отсутствие изменяет течение этого процесса.

Таким образом, в каждом из разделов, посвященных описанию экспериментальных исследований, получены важные результаты, но связь между ними и логические переходы от одного к другому не просматриваются. Закономерно, что обсуждать такие, на первый взгляд, разрозненные результаты, не просто. Возможно, поэтому разделу «Обсуждение» в работе отведено четыре страницы, на которых автор ограничивается перечислением полученных результатов, используя связки типа «Ещё одним интересным результатом данной работы является то, что нокаут гена Каизо приводит к изменению...». Заключение – ещё более лаконично и скорее напоминает короткое резюме статьи. Полагаю, что автором получены действительно новые и интересные результаты, достойные более подробного анализа.

В целом достоверность и надежность полученных результатов и выводов в работе В.С. Коростиной не вызывает сомнений и базируется на репрезентативности выборок,

использовании богатого методического арсенала, адекватного цели и задачам исследования, применением статистической обработки результатов исследования. Научные результаты получены лично соискателем. Основные положения диссертации обоснованы, выводы логически и полностью вытекают из результатов исследования. Работа написана ясным научным языком и наглядно иллюстрирована демонстрационным материалом, явно убеждающим в достоверности научных исследований.

Диссертационная работа В.С.Коростиной 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 молекулярно-генетические основы эпигенетической регуляции – ее основного механизма – метилирования ДНК. Результаты работы могут быть использованы в образовательных курсах по клеточной биологии и цитологии, молекулярной генетике, а также в научно-исследовательской работе Институтов и Университетов биологического и медицинского профиля. Высказанные в отзыве критические замечания не снижают качество работы в целом. Выводы работы адекватны полученным результатам, опубликованным в международных журналах и журналах из списка ВАК и представленным на различных научных конференциях. Содержание Автореферата хорошо соответствует содержанию диссертации. Тематика диссертации полностью соответствует специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология. 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, В.С.Коростиной, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени.

Зав. сектором ФГБУ «Федеральный исследовательский
центр Институт цитологии и генетики Сибирского
отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)
доктор биологических наук, профессор

Колосова Наталия Гориславовна



Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10
Телефон: +7(383) 363-49-80
Факс: +7(383) 333-12-78
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru



Ученый секретарь
И.Б.К. Орлова

