

«УТВЕРЖДАЮ»



Директор ФГБУН Института
молекулярной генетики РАН
Член-корреспондент РАН
С. В. Костров

31 марта 2014 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о диссертационной работе О. С. Кожевниковой
**«ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА СЕТЧАТКИ КРЫС OXYS
С ВОЗРАСТОМ ПРИ РАЗВИТИИ РЕТИНОПАТИИ»**,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07 - генетика

Актуальность и новизна исследования

Диссертационная работа О. С. Кожевниковой посвящена исследованию молекулярных основ возрастной макулярной дегенерации (ВМД). Актуальность и важность этой тематики не вызывает никаких сомнений. Действительно, по мере увеличения продолжительности жизни людей заболевания, ассоциированные с возрастом, привлекают все большее внимание. Эффективное лечение таких заболеваний невозможно без понимания их причин, в том числе, без знания тех молекулярных и генетических изменений и особенностей, которые лежат в основе патологии. Современная фармакологическая стратегия всё больше основывается на использовании мишень-специфических лекарственных препаратов. Этот подход подразумевает, что ключевые регуляторы патогенеза известны и охарактеризованы на молекулярном, генетическом и клеточном уровне. Научные исследования, позволяющие получить такие характеристики, в том числе и работа О. С. Кожевниковой, безусловно, востребованы в современном обществе. ВМД – это комплексное многофакторное заболевание. Исследование таких сложных патологий требует особых усилий, а каждая новая работа в этой области имеет особую ценность.

Особо хочется отметить, что работа 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 использует новейшие, ранее недоступные методы исследований, прежде всего, направленные на анализ дифференциальной экспрессии генов у больных и здоровых особей разного возраста. Благодаря этому проведенное О. С.

Кожевниковой исследование, базируясь на анализе уникальной биологической модели, проливает новый свет на генетические основы ВМД.

Структура и содержание работы. Критические замечания

Диссертация построена по стандартному плану. Хочется сразу отметить высокое качество научного текста – ясность и четкость изложения, богатый и информативный иллюстративный материал, подробный список сокращений, аккуратное оформление.

Введение написано очень удачно – сжато изложено современное состояние той области науки, в которой работает автор, описаны проблемы, заслуживающие дальнейшего изучения, поставлены цели и задачи конкретного исследования, представленного в диссертационной работе, хорошо сформулированы основные положения, выносимые на защиту по результатам работы автора. Во Введении приведены также публикации соискателя по теме диссертации, что удобно и позволяет сразу составить впечатление о высоком уровне работы. Действительно, три работы опубликованы в международных журналах с солидным импакт-фактором, а еще две – в российских журналах, так что и качество, и количество публикаций указывают на значимость и большой объем диссертационной работы.

«Обзор литературы», составляющий примерно треть диссертации, представляет собой систематизированную сводку данных, касающихся ВМД. Хорошо продуманная разбивка на главы облегчает восприятие материала и делает более ясным место проведенной автором работы в общем спектре работ в данной области науки. В обзоре рассмотрены особенности ВМД на уровне физиологических, включая возрастные и патологические изменения, и генетических основ заболевания, которые остаются во многом неясными. Отдельная глава посвящена уже проведенным исследованиям транскриптома сетчатки, что наиболее тесно связано с содержанием исследований, представленных в самой диссертационной работе. В обзоре рассмотрены также модели ВМД в сравнении с моделью, использованной автором, которой посвящена отдельная глава, подытоживающая предшествующую работу с крысами OXYS. Наконец, 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. Важно, что соискатель уже в Обзоре рассматривает недостатки методов, их слабые стороны и разработанные способы их коррекции при обработке результатов. Все положения Обзора подкреплены многочисленными ссылками на оригинальные работы различных авторов. Следует отметить, что библиография диссертационной работы очень внушительна – список процитированной литературы содержит 383 названия. С точки зрения изложения очень удачной следует признать небольшую главку, завершающую обзор литературы – «Заключение». В ней автор делает выводы из проведенного анализа научной литературы. Таким образом, завершение обзора литературы подводит к экспериментальной части диссертации, обосновывает и дополняет сформулированные во вводной части цели и задачи работы.

Раздел «Материалы и методы» содержит достаточно подробное описание использованных методов и подходов. Хочется отметить, что работа характеризуется большим разнообразием методов, многие из них достаточно сложны и трудоемки. Такой комплексный подход лежит в основе результативности работы, обуславливает ее безусловный научный интерес. В работе использованы несколько методов, направленных на решение основной задачи – анализа особенностей транскрипции генов, связанных с ВМД. Метод RNA-seq, являющийся наиболее новым и технологически изощренным, успешно использован соискателем. Однако хотелось бы отметить, что количество прочтений оказалось не очень большим, что могло внести искажения в полученные результаты. При использовании другого метода – обратной ПЦР в реальном времени – в качестве референсного соискатель использовал ген *Rpl30*. Стоило привести аргументы в пользу именно такого выбора. Кроме того, в последнее время для получения более надежных результатов часто используют не один, а два референсных гена, возможно, такой подход стоило использовать и в данной работе. Статистический анализ описан не вполне понятно. Так, осталось неясным, какие именно «полученные данные» были проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа. Возможно, стоило бы расширить эту главу, указав именно в ней, а не в других главах «Материалов и методов», какие данные обсчитывали с помощью дисперсионного анализа, что такое коэффициент вариации, приведенный в таблице 3, и как он рассчитывался; как считали коэффициенты корреляции, упомянутые на стр.81; и особенно – как проводили коррекцию на множественные сравнения (упоминание об этом есть в автореферате, но не в диссертации). Последнее было бы особенно желательно, поскольку текст на стр. 82, касающийся выбора критерия достоверности при компоновке первичных данных, не вполне понятен. Каким образом «консервативный уровень значимости с поправкой на множественные сравнения» может соответствовать $P=0,05$, если просто консервативный уровень значимости соответствует $P=0,05$? Я думаю, что дело не в ошибке, а просто в неудачном написании, и более подробное описание статистических методов в главе «Материалы и методы» сняло бы все вопросы.

Раздел «Результаты» состоит из семи глав, что отражает разнообразие подходов, использованных соискателем для исследования ВМД. Первые четыре главы посвящены исследованию QTL, отвечающих за преждевременное старение крыс OXYS. Соискатель дает весьма полное описание признаков ВМД в линиях с двумя разными итрогрессированными QTL (первая глава), а затем последовательно описывает решение задачи по исследованию значимых различий в транскрипции, обусловленных этими QTL. Не вполне понятно, почему было принято решение объединить два QTL для анализа онтологии генов и, далее, конструирования микрочипа. Как отмечает и сам соискатель, QTL и так представляют собой большие районы хромосом, включающие десятки и сотни генов. После выявления QTL последующий анализ всегда направлен на детализацию результата – уменьшение размера QTL и поиск отдельных генов-кандидатов. Действие в обратном направлении – объединение QTL – кажется неоправданным. Однако в целом данная часть диссертационной работы была проведена очень последовательно и разумно. Само по себе создание целевого микрочипа – это серьезная заслуга соискателя. Как показали опыты с гипокампом, этот микрочип может быть далее использован для исследования особенностей транскрипции включенных в микрочип генов в разных частях нервной системы. Оказалось, что экспрессия исследованных с помощью микрочипа и

входящих в QTL генов не связана с развитием ВМД. Этот результат является хорошей базой для корректировки алгоритмов подбора генов-кандидатов и успешного продолжения работы.

В четвертой главе также рассматриваются различия в транскрипции между крысами Вистар и OXYS, выявленные с помощью анализа микрочипов. Полученные результаты позволили сделать очень интересный вывод о вовлеченности метаболических путей, связанных с развитием болезни Альцгеймера, в контроль ВМД и о причинной взаимосвязи этих двух патологий.

Главы пять и шесть посвящены исследованию различий в транскрипции генов в линиях Вистар и OXYS с помощью метода RNA-seq. Это наиболее интересная часть работы, и потому, видимо, она же вызывает наибольшее число вопросов. Метод RNA-seq начали использовать не так давно, и адекватность различных методов анализа первичных данных еще не вполне ясна. Большая заслуга соискателя заключается в том, что для анализа данных использован не один, а два метода. Однако этот факт вносит некоторую путаницу в восприятии текста работы. Например, не указано, на основании какого метода распределены по уровню активность гены в таблице 2, какой материал проанализирован для таблицы 3, какой метод лег в основу анализа, иллюстрируемого рисунком 12. Ведь принцип компоновки первичных данных, полученных обоими методами, для дальнейшей обработки приведен позже (стр. 82). Учитывая новизну метода RNA-seq, соискатель использует многообразие способов обработки первичных данных, и это, безусловно, является сильной стороной диссертационной работы. Именно это позволяет получить внушительные содержательные итоги проведенной работы и выявить метаболические пути, преимущественно вовлеченные в развитие ВМД. Безусловно многократно усиливают работу и дополнительные эксперименты по оценке уровня экспрессии ряда генов с помощью обратной ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга, подтверждающие данные RNA-seq.

Наконец, седьмая глава содержит данные, демонстрирующие накопление амилоидного пептида в сетчатке крыс OXYS. Этот впечатляющий результат подтверждает данные, полученные с помощью анализа микрочипов, и проливает свет на природу ВМД как одного из нейродегенеративных заболеваний.

Несколько мелких замечаний. Стоило бы сказать, что такое теорема Дилуорса, а еще лучше – вообще не упоминать про нее, поскольку она не имеет непосредственного отношения к анализу данных. Соискатель использует и слово «прочтения», и слово «риды», и хотя последний вариант широко используется в устной неформальной речи, в тексте стоило бы оставить только слово «прочтения». Непонятно, что означает звездочка около последнего столбца на рисунке 11. В таблице 4 заголовок говорит и дифференциальной экспрессии генов, но упоминает только одну линию OXYS. На стр. 85, на 11 строке сверху имеется в виду низкий уровень экспрессии?

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

обсуждения результатов, что позволило соискателю удачно обобщить результаты проведенной работы.

«Выводы» работы четко сформулированы и отражают результаты работы. Хотелось бы только заметить, что вывод №4, хотя он и не является неправильным, можно было бы опустить, поскольку он фактически продолжен и конкретизирован в двух последующих выводах.

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

Диссертационная работа О. С. Кожевниковой является законченным, актуальным, оригинальным, выполненным на высоком научном и методическом уровне исследованием. Высказанные в отзыве критические замечания не снижают качество работы в целом. Работа имеет большую практическую ценность для выработки методов и средств лечения ВМД. Результаты работы могут быть также использованы в образовательных курсах по генетике, физиологии и других, а также в научно-исследовательской работе Институтов и Университетов биологического и медицинского профиля.

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, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, О. С. Кожевникова, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени.

Отзыв рассмотрен и одобрен на научном семинаре Отдела молекулярной генетики клетки ИМГ РАН 26 марта 2014 года (протокол № 2).

Заведующий лабораторией геномной изменчивости
ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН,
доктор биологических наук, профессор



Пасюкова Е. Г.

123182, Москва,
пл. Академика И. В. Курчатова, д. 2,
ИМГ РАН,
Тел.: 8(499)1961909
Факс: 8(499)1961909
e-mail: egpas@rambler.ru