

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Гуляевой Людмилы Федоровны на диссертационную работу Рединой Ольги Евгеньевны «Комплексное генетическое профилирование гипертонической болезни на модели стресс-чувствительной артериальной гипертонии - крысах линии НИСАГ», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – «Генетика»

Исследование молекулярно-генетических основ социально значимых и распространенных заболеваний человека, таких как гипертония, является одним из приоритетных направлений в современной молекулярной биологии и генетике. Диссертационная работа Рединой Ольги Евгеньевны посвящена поиску новых генов-кандидатов гипертонии на модели стресс-чувствительной формы артериальной гипертонии у крыс линии НИСАГ. Сложность такого рода исследований состоит в том, что данное заболевание является многофакторным, включающим как генетические, так и эпигенетические признаки. Несмотря на большое количество работ в этом направлении, многие вопросы, касающиеся механизмов патогенеза гипертонии, остаются не ясными. Обещающим подходом в этом направлении может быть применение современных пост-геномных технологий, которые стремительно развиваются в последнее время. В основе диссертационного исследования Рединой Ольги Евгеньевны лежит генетическое картирование фенотипических признаков гипертонии и сравнительное полногеномное профилирование уровня транскрипции генов у гипертензивной линии крыс НИСАГ и контрольных нормотензивных крыс линии Wistar Albino Glaxo (WAG).

В связи с вышесказанным считаю, что диссертационное исследование Рединой Ольги Евгеньевны является актуальным, полученные результаты имеют важное научное и научно-практическое значение. В результате проведенного исследования были выявлены новые гены и пути, ассоциированные с исследуемым заболеванием.

Диссертационная работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК и имеет традиционную структуру. В ней представлены такие разделы как: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Заключение», «Список литературы» и «Приложение». Материал диссертации изложен на 485 страницах машинописного текста, содержит 55 рисунков и 46 таблиц. Список цитированной литературы включает 725 источников, а также приложение, состоящее из 6 таблиц.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность выбранной темы, анализирует степень разработанности темы, формулирует цель и задачи диссертационной работы, раскрывает ее новизну и научно-практическую значимость. В этом разделе автор описывает методологию и методы исследования, а также положения, выносимые на защиту.

Сформулированные задачи последовательны и логичны, достаточны для достижения поставленных целей. Положения, выносимые на защиту, обоснованы, они соответствуют основным результатам проведенного автором исследования. Этот раздел диссертации содержит также информацию о личном участии автора в получении научных результатов, о степени достоверности, апробации результатов и публикациях по теме диссертационной работы.

Глава «Обзор литературы» имеет логично выстроенную структуру, представленную 17-ю подглавами и «Заключением». Данная глава содержит обширные сведения, основанные на глубоком анализе большого массива литературных данных, которые позволяют получить достаточно

полное представление о состоянии изучаемой проблемы. В этом разделе представлены современные данные о патогенезе гипертонии. Здесь изложены основные генетические факторы с примером моногенных форм гипертонии, рассматривается нейрогенная теория развития гипертонии и роль гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в регуляции уровня АД. В обзоре литературы подробно освещены физиологические аспекты функционирования этих органов, в том числе сердечнососудистой системы. В этой главе автором дается подробная морфо-функциональная характеристика исследуемой в работе крыс линии НИСАГ, приводятся различия ГНС, симпатoadреналовой, РААС и других гормональных систем у крыс НИСАГ в сравнении с контрольной нормотензивной линией. Отдельной подглавой (1.13) представлены данные о полногеномных методах анализа, применяемых для исследования полигенных признаков. Также автором дается подробное описание метода определения генетических локусов количественных признаков (QTLs), который используется в работе, а также метод RNA-Seq для секвенирования транскриптомов (1.14). Далее автор приводит данные о секвенировании геномов модельных крыс для изучения молекулярно-генетических механизмов развития полигенных заболеваний, а также интегративный геномно-транскриптомный подход для определения генов-кандидатов количественных признаков.

В целом, обзор литературы является достаточно полным обоснованием для постановки цели и задач диссертации, выбора методов оценки полученных результатов и их обсуждения. Обзор написан строгим научным языком, он свидетельствует о широком кругозоре автора и свободной ориентации в литературе по исследуемой проблеме.

В главе «Материалы и методы» подробно охарактеризованы модели крыс, используемые в работе, и достаточно детально описаны молекулярно-генетические методы. Здесь представлена общая таблица

(табл. 1) по сравнительной характеристике крыс линий НИСАГ и WAG и их гибридов F₁ в возрасте 6-и месяцев. Также в данном разделе представлена подробная информация о протоколах выделения ДНК и РНК из образцов различных органов крыс, описаны методы ПЦР для исследования межлинейных различий с использованием микросателлитных маркеров. Также приведен метода анализа транскриптомов (RNA-Seq) для выявления дифференциально экспрессирующихся генов. Автором описаны алгоритмы биоинформатической и статистической обработки полученных результатов секвенирования для функциональной аннотации генов и анализа паттерна ковариации линейных комбинаций.

В целом, диссертационная работа имеет высокий научно-методический уровень, выполнена на репрезентативной выборке животных и образцов тканей, автор владеет необходимыми для выполнения работы современными экспериментальными и биоинформатическими методами. Хотелось бы отметить полное соответствие выбранных автором подходов и методов поставленным целям и задачам диссертационной работы.

Глава «Результаты и обсуждение» посвящена описанию и обсуждению полученных автором результатов. Она структурирована логично и значительна по объему представленного фактического материала, хорошо иллюстрирована таблицами и рисунками, которые подтверждают достоверность полученных данных.

Полученные результаты разделены автором на три смысловые части. В первой части описывается определение генетических локусов гипертонии с помощью QTL анализа. Данная часть работы выполнена на двух группах самцов гибридов F₂(НИСАГxWAG) разного возраста – 3-4-х месяцев и 6-и месяцев. Изучаемые признаки были выбраны по их роли в регуляции симпатической нервной системы и гипоталамо-гипофизарно-

адренокортикальной оси. В результате проведенного исследования выявлены генетические локусы, ассоциированные с признаками АД, а также сделан вывод, что генетический контроль уровня АД и связанных с ним признаков у крыс НИСАГ зависит от возраста.

Во второй части данной главы автор описывает результаты транскриптомного анализа с целью выявления дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) в органах и тканях гипертензивных крыс НИСАГ и контрольных нормотензивных крыс WAG. Автором была проведена функциональная аннотация ДЭГ, что позволило выявить несколько групп генов, отвечающих на различные стимулы и стресс, в том числе с компенсаторными реакциями, направленными на поддержание гомеостаза, а также с иммунными и воспалительными процессами. Среди генов, экспрессия которых меняется у гипертензивных крыс, выделяются такие, как факторы транскрипции, гены арахидонового каскада, а также ферменты 2-й фазы метаболизма ксенобиотиков, участвующие в метаболизме стероидных гормонов и ответах на ксенобиотики. Кроме того, автором описаны и проанализированы другие биологические процессы, в которые вовлечены идентифицированные гены и сделано предположение о механизме влияния этих генов на патогенез гипертонии.

В третьем разделе главы «Результаты и обсуждение» автор проводит дальнейший анализ ДЭГ с целью поиска наиболее значимых, генов, продукты которых могут быть потенциальными мишенями для терапии. Автор подробно описывает использованные для этой цели подходы: анализ однонуклеотидных замен (SNPs), методы многомерной статистики, сравнительный анализ генов-кандидатов у крыс НИСАГ и WAG, а также определение генов-кандидатов на основании их положения в QTLs. Автор сравнивает используемые им подходы с уже существующими, а также проводит сравнение результатов с опубликованными данными других научных коллективов. Анализируя

однонуклеотидные замены в кодирующих последовательностях генов различных линий крыс, автор приходит к заключению, что гипертония является генетически полиморфным заболеванием, не имеющим единой этиологии. Тем не менее, был выделен ключевой ген, вовлеченный в развитие гипертонии у крыс линии НИСАГ. Это ген, кодирующий растворимую эпоксид-гидролазу (sEH), фермент, участвующий в арахидоновом каскаде. Результаты QTL анализа и сравнительного анализа транскриптомов позволили эффективно выявлять позиционные гены-кандидаты в локусах, ассоциированных с основными фенотипическими признаками развития АГ: с уровнем АД в покое и при стрессе, а также с физиологическими признаками.

В целом, автор проводит глубокий анализ и обобщение полученных результатов с привлечением современных литературных сведений. Стиль и логика обсуждения результатов, выдвигаемые выводы свидетельствуют об эрудиции и глубоком понимании автором результатов работы.

В ходе выполнения диссертационной работы Рединой Ольгой Евгеньевной получены принципиально новые научные результаты, анализ которых позволил успешно решить все поставленные задачи. Результаты исследования вносят вклад в развитие представлений о патогенезе гипертонической болезни на молекулярно-генетическом уровне и генетических особенностях этого заболевания.

К каждому из трех разделов «Результаты и обсуждение» автор делает заключение, в котором излагает наиболее важные итоги проведенного исследования. В основе выдвигаемых научных положений лежит тщательный анализ поставленной проблемы в целом и полученных автором результатов в частности. Автор формулирует двенадцать выводов. Все они опираются на глубокий анализ материалов

исследования, хорошо аргументированы, соответствуют заявленным цели и задачам исследования.

Таким образом, автором выполнено исследование на актуальную тему, получен значительный массив экспериментальных данных, проведен их глубокий анализ и обобщение. Несомненно, что результаты исследования отличаются научной новизной, имеют как теоретическую, так и практическую ценность. Научные положения, выносимые на защиту, обоснованы и полностью отражают результаты каждого этапа исследования. Обоснованность и достоверность выводов не вызывает сомнений.

Автореферат диссертации Рединой Ольги Евгеньевны написан по требуемой форме и полностью соответствует содержанию выполненной диссертационной работы, в нем отражены актуальность темы, научная новизна, практическая значимость, основные результаты и их обсуждение и выводы.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в рецензируемых российских и международных журналах (29 публикаций). Материалы диссертации докладывались на многих международных и всероссийских научных конференциях.

Существенных замечаний по сути работы нет. При чтении настоящей диссертационной работы возникли некоторые вопросы дискуссионного характера, которые не носят принципиального характера и не снижают качества выполненной работы и обоснованности полученных результатов:

1. В «Обзоре литературы» много внимания уделяется физиологическим аспектам гипертонии, с детальным описанием физиологии органов-мишеней. Все это делает обзор очень громоздким. В то же время, молекулярно-генетические аспекты, как например, арахидоновый каскад с выходом метаболитов EETs и HETE_s, их рецепции,

или, например, генетика гипертонии человека, представлены весьма скромно.

2. При исследовании возрастных различий гипертензивного статуса крыс НИСАГ в экспериментах использовались 3-4-х и 6-ти месячные животные. Не объяснено, почему были взяты именно эти возрасты и почему не исследовались более старые животные?

3. При исследовании уровня экспрессии растворимой эпоксид-гидролазы (с. 320) уровни мРНК в исследуемых органах крыс НИСАГ увеличивались 10-25 раз по сравнению с крысами WAG, тогда как содержание белка – в 1,5 раза. Автор не обсуждает причины таких различий.

4. Говоря о роли некоторых генов в развитии ГБ, почему автор не проводит ROC анализ, используемый для подтверждения клинического значения?

5. Цель работы автора состоит в «выявлении молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе развития стресс-чувствительной формы артериальной гипертонии у крыс линии НИСАГ». Однако в заключении работы автор не приводит интегральной схемы таких механизмов. На мой взгляд, результатом работы является выявление новых и подтверждение уже известных кандидатных генов развития гипертонии у крыс НИСАГ. Говорить о механизмах пока преждевременно.

Диссертационная работа Рединой Ольги Евгеньевны «Комплексное генетическое профилирование гипертонической болезни на модели стресс-чувствительной артериальной гипертонии - крысах линии НИСАГ» является самостоятельной законченной научной работой, в которой решена актуальная научная задача современной генетики – найдены новые гены-кандидаты гипертонии у крыс НИСАГ. По актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне, степени достоверности

результатов, теоретической и практической значимости представленная работа полностью соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Редина Ольга Евгеньевна достойна присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – «Генетика».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
профессор по специальности «Молекулярная биология»,
Руководитель Лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза,
Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики
(НИИМББ) – структурное подразделение ФИЦ «Фундаментальная и трансляционная медицина».

Людмила Федоровна Гуляева

Подпись Людмилы Федоровны Гуляевой заверяю:

«19» марта 2020 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр фундаментальной и

трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования
Российской Федерации

630117, Россия, Новосибирск, ул. Тимакова, д. 2/12

Тел.: +7 (383) 335-65-37

E-mail оппонента: lfgulyaeva@gmail.com

Сайт организации: <https://frcftm.ru/>