

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Рединой Ольги Евгеньевны на тему: «Комплексное генетическое профилирование гипертонической болезни на модели стресс-чувствительной артериальной гипертензии - крысах линии НИСАГ», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность темы

В большинстве экономически развитых стран, артериальная гипертензия является одним из наиболее распространенных сердечно-сосудистых заболеваний и до настоящего времени является одним из основных факторов риска смерти. Несмотря на значительные успехи в ее лечении с помощью существующих антигипертензивных препаратов, распространенность резистентной к лечению гипертензии составляет около 14 %. Изучение молекулярно-генетических основ заболевания на популяциях человека имеет множество ограничений, поэтому для таких исследований часто и успешно используют гипертензивные линии крыс (или мышей), моделирующих различные формы артериальной гипертензии. Соответственно, тема представленной диссертационной работы, проведенной на уникальной линии крыс, моделирующих стресс-чувствительную форму артериальной гипертензии, и направленной на выявление молекулярно-генетических особенностей развития этой формы заболевания, является высоко актуальной.

Научная новизна и объем исследования

Линия крыс НИСАГ была селектирована на базе Института цитологии и генетики СО РАН и является оригинальной моделью стресс-чувствительной формы артериальной гипертензии. В результате многолетних работ данная линия была подробно охарактеризована по многим физиологическим и биохимическим параметрам, что позволило ей занять достойное место в ряду других гипертензивных линий крыс, селектированных в зарубежных лабораториях. Оригинальность использованной модели однозначно определяет новизну результатов, полученных в диссертационной работе Рединой Ольги Евгеньевны. Важным достоинством работы является то, что Ольга Евгеньевна впервые при изучении молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе развития артериальной гипертензии у крыс НИСАГ, применила методические подходы (геномное картирование и секвенирование транскриптома), позволяющие провести полногеномный анализ. Эти подходы позволили эффективно получить максимально полную информацию об особенностях генетического контроля уровня АД и коморбидных нарушений у данной линии крыс.

В работе Ольги Евгеньевны впервые на крысах НИСАГ было проведено генетическое картирование (QTL анализ) 15 фенотипических признаков, характеризующих гипертензивный статус крыс НИСАГ, и найдены генетические локусы, ассоциированные с этими признаками. Данная работа была проведена на двух группах крыс разного возраста, что позволило выявить особенности генетического контроля изучаемых признаков в процессе взросления и развития у животных гипертонии. Кроме того, в диссертационной работе впервые представлены данные генетического профилирования с помощью секвенирования транскриптомов (метод RNA-Seq) двух структур мозга (ствол мозга и гипоталамус), в которых находятся центры регуляции уровня артериального давления, и периферических органов - надпочечников и почек, которые являются эффекторными звеньями и органами мишенями при развитии гипертонии. Результаты RNA-Seq анализа позволили выявить многочисленные гены, дифференциально экспрессирующиеся у гипертензивных крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивным контролем в стволе мозга, гипоталамусе, надпочечниках, корковом и мозговом веществе почек, и, соответственно, в каждом из этих органов/тканей сделать подробное описание основных биологических процессов и метаболических путей, которые могут быть вовлечены в процесс развития стресс-чувствительной артериальной гипертонии у крыс НИСАГ. Кроме того, результаты секвенирования транскриптомов были использованы для сравнения нуклеотидных последовательностей транскриптома крыс НИСАГ с последовательностями геномов 11 линий и сублиний крыс, моделирующих другие формы АГ, а также с геномами более 30 других линий крыс, являющихся генетическими моделями других патологий. Этот анализ позволил выявить нуклеотидные замены, встречающиеся только у гипертензивных линий крыс, а также нуклеотидные замены, специфические для крыс НИСАГ.

Результаты выполнения двух подходов (QTL анализ и RNA-Seq), позволяющих провести полногеномные исследования позволили соискателю собрать максимально полную информацию для описания особенностей молекулярно-генетических механизмов развития стресс-чувствительной формы гипертонии у крыс НИСАГ и именно полнота собранной информации позволила провести работу по выявлению ключевых генов-кандидатов. Для этого были использованы несколько подходов, что является безусловным достоинством работы. Наиболее оригинальным в этой части работы является подход с использованием методов многомерной статистики (PLS-DA, partial-least squares discriminant analysis), который позволил выявить гены, делающие максимальный вклад в межлинейные различия. Эффективным оказался и

интегративный подход к определению позиционных генов-кандидатов, т.е. дифференциально экспрессирующихся генов, вовлеченных в генетический контроль изучаемых признаков и локализованных в генетических локусах, ассоциированных с этими признаками.

Таким образом, соискателем была проведена огромная работа и впервые на изучаемой линии крыс были получены абсолютно оригинальные и максимально полные результаты, в точности соответствующие цели и задачам, поставленным в диссертационной работе.

Оценка достоверности полученных результатов

При постановке задач для достижения выбранной цели автором были проанализированы известные достижения и теоретические положения других российских и зарубежных исследователей, направленных на изучение молекулярно-генетических механизмов развития гипертонии у других гипертензивных линий крыс. Такой подход к планированию и выполнению работы позволил выбрать наиболее адекватные и эффективные методы для достижения результатов по каждой из поставленных задач. Обсуждение полученных результатов показало высокую согласованность полученных результатов с результатами исследований на других линиях гипертензивных крыс. Это подтверждает достоверность полученных в диссертационной работе результатов и, с другой стороны, вызывает доверие к впервые полученным данным, отражающим специфику стресс-чувствительного генотипа.

Для анализа полученных данных автором использовались в основном общепринятые методы статистической обработки. Однако, следует отметить оригинальность подхода к выявлению генов, дающих максимальный вклад в межлинейные различия, для которого были использованы методы многомерной статистики (метод главных координат, PLS-DA) и корреляционный анализ. Использование этих методов при обработке транскриптомных данных является, безусловно, украшением работы.

Достоверность представленных в диссертационной работе результатов подтверждается также тем, что все они опубликованы в рецензируемых ведущих отечественных и зарубежных научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также широко обсуждались на Российских и международных конференциях, в том числе на 4 зарубежных специализированных конференциях, работа которых была полностью посвящена проблемам, связанным с артериальной гипертонией. Всего по теме диссертации опубликовано 29 статей (23 из них опубликованы в журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science). Две публикации представлены в сборниках статей и 53 публикации тезисов представлены в материалах 35 Российских и международных конференций.

Степень обоснованности выводов и научных положений, выносимых на защиту

И выводы и научные положения, выносимые на защиту, логически вытекают из результатов проведенных исследований, они объективны, полностью обоснованы и не вызывают сомнений. Достоверность, как выводов, так и научных положений, выносимых на защиту, подтверждается большим объемом и отличной продуманностью выполненного исследования, в котором все части поставленных экспериментов хорошо согласуются между собой. Исследования проведены с использованием современных методов, грамотно выбранных и методически правильно выполненных.

Теоретическая и практическая значимость работы

Анализ изложенного в диссертации материала и сделанные автором выводы однозначно убеждают в том, что в процессе работы создана фундаментальная основа, имеющая как широкое теоретическое, так и практическое значение. Полногеномное картирование признаков артериального давления в покое и при стрессе, а также признаков, часто сопровождающих развитие гипертонии, позволило получить развернутую картину генетического сцепления этих признаков. Следует отметить важность того, что QTL анализ был проведен на двух группах животных разного возраста, что позволило получить представление об изменениях генетического контроля анализируемых признаков в процессе взросления животных. Эти данные, безусловно, являются полезными для развития представлений о функциональных изменениях в организме, которые требуют корректировки при прогрессировании гипертонической болезни. Картирование признаков показало, в каких генетических локусах присутствие аллелей крыс НИСАГ может увеличивать значение признака, а в каких локусах, наоборот, уменьшать значение признака, что является полезным для выявления генов-кандидатов, ассоциированных с развитием патологии, либо с адаптивным ответом, направленным на восстановление гомеостаза. Кроме того, с помощью геномного картирования были выявлены общие локусы для нескольких признаков, что позволило определить новые позиционные гены кандидаты для признаков артериального давления в покое и его прироста при стрессе.

Анализ транскриптомных данных, проведенный для двух структур мозга, имеющих центры регуляции артериального давления, и для периферических органов-мишеней (надпочечников и почек), выявил значительное число дифференциально экспрессирующихся генов, среди которых многие уже сегодня являются ассоциированными с гипертонией, а многие другие могут представлять потенциальный интерес при дальнейшем изучении, как фундаментальных основ развития гипертонии, так и для выбора конкретных генов-кандидатов для рассмотрения возможностей их использования в качестве мишеней при

терапевтическом воздействии. Все, полученные в работе данные находятся в открытом доступе. Данные RNA-Seq депонированы в международную базу данных Short Read Archive NCBI, а уже обработанные данные (списки генов, дифференциально экспрессирующихся в проанализированных органах/тканях крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивными контрольными крысами WAG, а также данные, характеризующие нуклеотидные варианты, встречающиеся в транскриптом крыс НИСАГ) находятся на сайте лаборатории, в которой выполнялась данная работа.

Полученные в ходе выполнения диссертационной работы данные можно рассматривать как новый фундаментальный ресурс, как для дальнейших научных исследований, так и для практических разработок, направленных на определение потенциальных мишеней для терапии или профилактики гипертонической болезни, а также сопутствующих патологий. Полученные соискателем результаты являются полезным дополнением к результатам аналогичных работ, выполняемых в зарубежных лабораториях на линиях крыс и мышей, моделирующих другие формы артериальной гипертонии.

Содержание и оформление диссертации

Диссертация изложена на 485 страницах машинописного текста. Она имеет стандартную структуру и содержит все необходимые разделы. Текст диссертации состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, и главы Результаты и обсуждение, состоящей из трех разделов, в каждом из которых представлены результаты, их обсуждение и краткое заключение, выводов и списка цитируемой литературы, в который входит 725 ссылок, включая 50 ссылок на отечественные работы, а также приложение, состоящее из 6 таблиц. В конце диссертации дан полный список публикаций по теме диссертационной работы, кратко подведены итоги выполненного исследования, очерчены перспективы дальнейшей разработки темы и приведен список сокращений и условных обозначений.

Диссертация написана грамотно и понятно. Материал изложен в логичной последовательности, содержит 46 таблиц и иллюстрирован 55 рисунками, что является абсолютно достаточным для понимания и интерпретации представленных данных.

Во **Введении** дано краткое, но убедительное обоснование актуальности работы, показана степень разработанности темы, обоснована и четко сформулирована цель исследования, дано объяснение выбора методологии и конкретных методических подходов для достижения поставленной цели. Четкое понимание цели и методических подходов позволило сформулировать логичные и понятные задачи для последовательного выполнения

запланированного исследования. Кроме того, во Введении подробно изложена научная новизна работы, ее теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, приведены сведения о публикации и апробации результатов исследования, о структуре и объеме работы, определен вклад соискателя в работу и выражена благодарность коллегам по работе.

Суммируя информацию, представленную во Введении, следует отметить, что текст во всех подразделах является лаконичным, понятным, информативным. Особо следует отметить корректность формулировок цели и поставленных задач, а также четкость формулировок и обоснованность положений, выносимых на защиту, которые полностью базируются на результатах, полученных при выполнении представленной диссертационной работы.

Обзор литературы представлен на 73 страницах. В нем изложены современные представления о роли генетического контроля в развитии гипертонии, дано описание основных физиологических систем, вовлеченных в процесс развития заболевания, описаны существующие модели животных (крыс и мышей), используемые в мире для изучения физиологических и молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе развития гипертонии. Особое внимание уделено описанию морфологических, биохимических и эндокринологических особенностей линии крыс НИСАГ, на которой проводилось исследование. В главе **Обзор литературы** дается и характеристика тех методических подходов, которые автор далее использовала в исследовании. При прочтении краткого заключения к этой главе становится полностью понятна стратегия построения эксперимента и обоснованность выбора конкретных методических подходов, которые могут максимально эффективно решить поставленные в работе задачи для достижения выбранной цели.

В главе **Материалы и Методы** дано подробное описание использованных в экспериментах животных и описание методов. Описание методов дано в целом лаконично, но при этом указаны все существенные детали, даны ссылки на использованные программы и базы данных.

Глава **Результаты и обсуждение** состоит из 3 разделов.

В первом разделе главы 3 приводятся результаты QTL анализа, с помощью которого в двух группах самцов гибридов F_2 (НИСАГ \times WAG) разного возраста были проанализированы 15 признаков, включающих уровень АД в покое и при воздействии эмоционального стресса, а также признаков, которые сопровождают развитие гипертонии. Результаты позволили для ряда признаков определить генетические локусы, высокодостоверно ассоциированные с некоторыми из изучаемых признаков в обеих возрастных группах животных. Статистически

вероятные ассоциации были найдены для всех изучаемых признаков. Результаты сканирования генома продемонстрировали сложную генетическую архитектуру изучаемых фенотипических признаков. Важно, что некоторые из найденных в работе локусов ранее уже были ассоциированы с теми же признаками у других линий крыс, что убеждает в достоверности полученных в диссертационной работе результатов. Некоторые локусы в настоящей работе были описаны впервые. QTL анализ был проведен на крысах НИСАГ впервые, а некоторые признаки (абсолютный и относительный вес селезенки) были картированы впервые у крыс. Работа позволила определить в каждом из описанных локусов эффект аллелей крыс НИСАГ на проявление признака. Эти результаты являются очень важными, так как могут быть использованы в дальнейшей работе при выявлении генов-кандидатов, ассоциированных с развитием патологии, либо с адаптивным ответом, направленным на восстановление гомеостаза.

В группе самцов гибридов F_2 (НИСАГ \times WAG) в возрасте 3-4-х месяцев в трех локусах (на хромосомах 11, 15 и X) присутствие аллелей крыс НИСАГ было ассоциировано с достоверным увеличением прироста уровня АД при воздействии стресса. Соответственно, именно в этих локусах могут находиться гены, которые являлись ключевыми в процессе селекции крыс НИСАГ по признаку повышения уровня АД в ответ на воздействие эмоционального стресса.

В группе самцов гибридов F_2 (НИСАГ \times WAG) в возрасте 6-и месяцев в дистальной части хромосомы 1 был выявлен локус общий для признаков 'уровень АД в покое' и 'уровень АД при воздействии стресса', что объясняет сцепленность данных признаков в процессе проведения селекции.

Были определены генетические локусы, общие для двух или нескольких признаков. Эта часть работы позволила выявить вспомогательные фенотипы для поиска позиционных генов-кандидатов в локусах, ассоциированных с признаками уровня артериального давления.

То, что QTL анализ был проведен в двух возрастных группах самцов гибридов F_2 (НИСАГ \times WAG), позволило увидеть изменения генетического контроля анализируемых признаков в процессе взросления животных.

Второй раздел главы 3 посвящен сравнительному анализу транскриптомов ствола мозга и гипоталамуса, в которых находятся центральные звенья регуляции артериального давления, а также надпочечников и почек, являющихся эффекторными звеньями и мишенями при развитии гипертонии. В этом анализе использовали гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс WAG в возрасте 3 месяцев, так как в QTL анализе именно при изучении группы животных этого возраста были найдены 3 локуса, в которых присутствие аллелей крыс НИСАГ приводило к статистически значимому увеличению значения признака прирост уровня артериального давления при стрессе, по которому

проводилась селекция крыс НИСАГ. Соответственно, анализ транскриптомов органов-мишеней у крыс НИСАГ именно этой возрастной категории мог наиболее точно охарактеризовать картину сопряженных с селекцией изменений в уровне транскрипции генов у стресс-чувствительного организма при развитии генетически обусловленной гипертонии. В результате проведения секвенирования транскриптомов в каждом из пяти выбранных органах/тканях автору удалось выявить многочисленные гены, дифференциально экспрессирующиеся у гипертензивных крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивными контрольными крысами WAG и выявить среди них гены, уже ассоциированные с гипертонией к настоящему времени. Была проведена функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся генов и выявлены основные биологические процессы и метаболические пути, дающие вклад в различия функционирования взятых в анализ органов/тканей у сравниваемых линий крыс. Эта работа была проведена на крысах НИСАГ впервые.

В третьем разделе главы 3 используются данные, полученные в первых двух разделах с целью выявления ключевых генов-кандидатов, вовлеченных в генетический контроль изучаемых в работе признаков. Результаты этой части работы показали, что генов, которые в дальнейшем могут быть использованы как потенциальные мишени для терапии и/или профилактики гипертонической болезни много. Тем не менее, на основании нескольких использованных подходов был выявлен ген *Ephx2*, кодирующий растворимую эпоксидгидролазу, который можно рассматривать как один из наиболее перспективных генов-кандидатов для дальнейшего изучения возможности его использования в качестве мишени для фармакологического воздействия, направленного на профилактику или коррекцию гипертензивного состояния при развитии стресс-чувствительной формы гипертонии. Были также выявлены два новых позиционных гена-кандидата с помощью интегративного геномно-транскриптомного подхода, что является безусловным успехом представленной диссертационной работы.

Очень интересной и значимой частью работы является проведенный анализ нуклеотидных замен (SNPs), найденных в геноме крыс НИСАГ по сравнению с последовательностями геномов других 42-х линий и сублиний крыс, 11 из которых моделируют спонтанную, либо индуцированные формы гипертонии. Работа выявила 1849 SNPs, которые являются специфическими для крыс линии НИСАГ. А среди 158 SNPs, встречающихся только у гипертензивных линий крыс не было определено ни одного SNP, общего для всех 12 взятых в анализ линий гипертензивных крыс, в результате чего было сделано заключение о высокой

специфичности молекулярно-генетических механизмов развития артериальной гипертонии у линий крыс, моделирующих разные формы гипертонии.

В главе 3 после каждого раздела автором дается краткое заключение, концентрирующее внимание читателя на наиболее важных результатах, приводящих к обобщениям и выводам.

Выводы, представленные в диссертационной работе, полностью следуют из полученных результатов. Они понятно и корректно сформулированы и в полной мере отражают содержание проведенного исследования. Обоснованность и достоверность выводов, сделанных автором, не вызывает сомнений.

Автореферат оформлен согласно предъявляемым к нему требованиям. Текст автореферата соответствует тексту диссертационной работы, в нем отражены все основные положения диссертационной работы и выводы, достаточно полно представлен и хорошо проиллюстрирован экспериментальный материал.

Полученные в диссертационной работе результаты исследования высоко достоверны и не вызывают сомнений. Результаты работы имеют высокую научную ценность и являются полезным дополнением к результатам аналогичных работ, выполняемых в зарубежных лабораториях на линиях крыс и мышей, моделирующих другие формы артериальной гипертонии. Результаты могут быть использованы для определения как общих, так и специфических молекулярных детерминант при изучении разных моделей артериальной гипертонии с целью определения потенциальных мишеней для терапии или профилактики гипертонии, а также сопутствующих патологий. Полученные результаты могут быть рекомендованы и для использования при чтении лекционных курсов в ВУЗах при подготовке специалистов в области генетики, медицинской генетики и физиологии.

Замечания

1. В результате сравнения нуклеотидных вариантов в генотипах нескольких гипертензивных линий крыс, включая крыс НИСАГ, автор приходит к заключению, что «артериальная гипертония является генетически гетерогенным заболеванием, не имеющим единой этиологии, что диктует необходимость разработки персонализированного подхода к диагностике, лечению и профилактике гипертонической болезни в клинике». Однако такое утверждение может быть справедливым только при условии, что у человека наблюдается такое же генетическое детерминирование артериальной гипертонии, как и у крыс, а это не столь очевидно. В диссертационной работе эта сторона вопроса осталась практически без обсуждения.

2. При прочтении диссертации к автору возникло несколько вопросов:

- Следует ли из работы, что для диагностики гипертонической болезни надо проводить генотипирование?
- Поможет ли генотипирование подобрать терапию в сложных клинических случаях?
- В рамках полученных в исследовании результатов, что есть стресс-индуцированная гипертония - стресс, нормальная жизнь или болезнь?

Высказанные замечания не влияют на оценку значимости и достоверности полученных результатов и сделанных выводов, и не снижают научную значимость диссертационной работы и ее общую высокую положительную оценку.

Заключение

Диссертационная работа Рединой Ольги Евгеньевны «Комплексное генетическое профилирование гипертонической болезни на модели стресс-чувствительной артериальной гипертонии - крысах линии НИСАГ», представленная на соискание научной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика, является завершенной научно-исследовательской работой, выполненной на высоком современном техническом уровне. Соискателем проведен огромный объем работы и получены новые результаты, достоверность которых не вызывает сомнений. Результаты выполненной работы, вносят значительный вклад в понимание генетических основ многофакторных социально значимых заболеваний, в частности, молекулярно-генетических механизмов, вовлеченных в развитие стресс-чувствительной формы артериальной гипертонии у крыс линии НИСАГ.

Диссертационная работа написана грамотно, хорошим литературным языком. Изложение этапов исследования и полученных результатов сделано в логичном порядке, автор четко и понятно доносит свои мысли до читателя. Название диссертации полностью отражает комплекс выполненных исследований. Цели и задачи полностью соответствуют выполненной работе, выводы полностью отражают полученные результаты и не вызывают сомнений. Все представленные в диссертационной работе результаты опубликованы в

рецензируемых профильных ведущих отечественных и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК, и широко обсуждены на научных конференциях. Тема диссертации, публикации по работе и положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют специальности 03.02.07 – генетика.

Представленная работа по своей актуальности, научной значимости и новизне полученных результатов, соответствует всем требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении научных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор Редина Ольга Евгеньевна заслуживает присуждения ей искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Официальный оппонент

Кривошеков Сергей Георгиевич,
профессор, доктор медицинских наук,
главный научный сотрудник, заведующий отделом «Функциональных резервов
организма и спортивной медицины» Научно-исследовательского института
физиологии и фундаментальной медицины,
Адрес: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4
Тел.: +7(383)373-02-91
Email: krivosch@physiol.ru

Подпись доктора медицинских наук, профессора С.Г. Кривошекова заверяю:

Начальник отдела кадров

16.03.2020 г.



А.П.Колодишникова