

ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора биологических наук
Зенковой Марины Аркадьевны на диссертацию**

Рединой Ольги Евгеньевны

**на тему «Комплексное генетическое профилирование гипертонической
болезни на модели стресс-чувствительной артериальной гипертонии -
крысах линии НИСАГ»**

**на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.02.07 – генетика.**

Артериальная гипертония – одно из наиболее распространенных заболеваний человека является мультифакторным заболеванием, в возникновение которого определяют как факторы внешней среды, так и генетически обусловленная предрасположенность. Механизмы развития гипертонической болезни у человека могут быть различными, однако, именно повышенное давление является основным фактором риска инвалидизации или смерти от сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с повышенным давлением. Следует отметить, что применяемая в настоящее время антигипертензивная терапия включает в препараты, позволяющие нормализовать давление и тем самым уменьшить повреждающее действие высокого давления на органы–мишени, однако, при этом отсутствуют препараты «убирающие» в организме причину развития гипертонической болезни. В связи с этим поставленная в диссертационной работе О.Е. Рединой задача - выяснение генетических механизмов, лежащих в основе развития стресс-зависимой гипертонии, является, несомненно, актуальной, а результаты ее исследования важными для медицинской генетики и медицинской химии, так как выявляют новые потенциальные молекулярные мишени для терапии и/или профилактики гипертонии.

Комплексное исследование генетических механизмов, лежащих в основе развития стресс-зависимой гипертонии, было проведено соискателем с использованием модели - гипертонивных крысах линии НИСАГ с использованием широкого набора генетических подходов: (QTLанализ), технологии глубокого секвенирования (RNA seq), биоинформативных подходов, глубокого статистического анализа достоверности получаемых результатов и верификации данных методами молекулярной биологии и биохимии, что позволило получить новые теоретически значимые результаты.

- О.Е. Рединой выявлены генетические локусы, ассоциированные как с уровнем артериального давления в покое и при стрессе, так и со вторичными признаками, сопровождающими развитие гипертонии у крыс НИСАГ. Это вес

тела, надпочечников, почки, сердца, селезенки, концентрация кортикостерона в плазме крови. Кроме того, ею были обнаружены изменения генетического контроля анализируемых признаков в процессе взросления животных.

- Анализ данных RNA-seq позволил соискателю идентифицировать дифференциально экспрессирующиеся гены у гипертензивных по сравнению с нормотензивными животными в двух структурах мозга, ответственных за регуляцию артериального давления, а также в периферических органах, связанных с развитием артериальной гипертонии, и описать биологические процессы и метаболические пути, которые могут быть задействованы при гипертонии у крыс линии НИСАГ.

- О.Е. Редина показала, что ген *Erx2*, многократное повышение уровня экспрессии которого во всех проанализированных органах крыс линии НИСАГ, что было показано экспериментально, является одним из наиболее перспективных генов-мишеней для создания препаратов, направленных на коррекцию гипертензивного состояния при развитии стресс-чувствительной формы гипертонии.

- О.Е. Редина достоверно показала, что разные формы гипертонии, воспроизводимые на известных генетических моделях крыс, характеризуются наличием специфических молекулярно-генетических механизмов развития, что характеризует данную гипертонию как генетически гетерогенное заболевание, не имеющее единой этиологии. Полученные результаты показывают необходимость персонализированных подходов к диагностике, лечению и профилактике данного заболевания в клинике.

Достоверность результатов и выводов диссертационной работы О.Е. Рединой основана на а) использованном в работе объекте исследования - линии крыс НИСАГ с наследуемой стресс-зависимой гипертензией, б) большом объеме разнообразных методов исследования, дополняющих один другого и повышающих достоверность полученных результатов, а также в) на тщательном анализе полученных данных.

В плане практической значимости результатов и выводов диссертационной работы О.Е. Рединой следует отметить следующее:

1) полученные данные позволяют эффективно выявлять гены-кандидаты в локусах, ассоциированных с уровнем артериального давления в покое/стрессе и с такими признаками гипертензии как гипертрофия органов-мишеней, увеличение уровней кортикостерона крови в покое/стрессе;

2) результаты работы могут быть использованы для определения потенциальных мишеней для создания средств терапии или профилактики как самой гипертонической болезни, так и сопутствующих патологий, являющихся ее следствием.

Характеристика диссертации. Диссертационная работа Ольги

Евгеньевны представляет собой законченное исследование, оформление которого соответствует всем требованиям, предъявляемым к оформлению докторских диссертаций. Диссертация изложена на 485 страницах машинописного текста и содержит 46 таблиц и 55 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, трех глав, в которых представлены результаты проведенных исследований и их обсуждение, выводов и списка цитируемой литературы, в который входит 725 ссылок, а также Приложение, состоящее из 6 таблиц.

Во **Введении** к диссертации Ольгой Евгеньевны раскрыты актуальность направления исследований и степень ее разработки, отмечены основные направления исследований в области изучения механизмов возникновения гипертонической болезни, а также сформулированы цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту. Кроме этого, во введении кратко рассмотрены методология и методы исследования, использованные в работе, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, приведен список всех конференций, на которых были представлены результаты исследований, указан личный вклад автора.

Обзор литературы (Глава 1) не имеет общего названия и фактически состоит из трех больших частей. В первой части обзора (разделы 1.1 – 1.10) рассмотрены роль симпатической нервной системы в развитии гипертонической болезни, а также регуляция ее активности и механизмы активации, приводящие к повышению артериального давления. Автор подробно рассматривает роль гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, надпочечников, почек, сердца, ренин-ангiotензин-альдостероновой системы в развитии гипертонической болезни, а также роль стрессорных факторов при развитии гипертензии. *Эта часть обзора дает общее представление о физиологических аспектах регуляции артериального давления, однако, она мало связана с темой диссертации и с собственно генетическим профилированием при гипертонической болезни.* Вторая часть обзора описывает существующие генетические модели артериальной гипертензии млекопитающих (разделы 1.11.) и крыс линии НИСАГ - модель стресс-чувствительной артериальной гипертензии, использованную в данной диссертационной работе (Раздел 1.12.). *При описании моделей также большое внимание уделено физиологическим нарушениям, повреждению внутренних органов при развитии того или иного типа гипертензии, какое-либо упоминание известных (или неизвестных) генетических аспектов развития гипертензии на этих моделях автором не приведено.* В третьей части обзора (разделы 1.13 – 1.17.) О.Е. Редина рассматривает методологию генетического профилирования гипертонической болезни, рассматривает принципы и сравнивает возможности и ограничения QTL-анализа, анализа экспрессии генов на микрочипах и с помощью глубокого секвенирования (RNA seq) и приводит работы, в которых подобные исследования выполнены на крысах,

моделирующих различные формы артериальной гипертонии. Именно этот раздел обзора литературы напрямую связан с тематикой диссертации, поэтому вызывает сожаление, что он краткий (около 20 стр) и также кратко процитированы работы, наиболее близкие теме диссертации.

Глава 2. Материалы и методы представляет собой краткое, но емкое представление об использованных методических подходах, а также необходимую информацию о том, в каких базах данных были аннотированы полученные результаты генетического профилирования.

Результаты и их обсуждение Глава 3 фактически состоит из трех отдельных глав, описывающих последовательно результаты QTL-анализа, проведенного для крыс линий НИСАГ, WAG и гибридов F_2 (НИСАГ×WAG) (Глава 3.1.), анализ транскриптомов различных тканей/органов крыс НИСАГ и WAG в возрасте 3 мес. (Глава 3.2.) и определение генов-кандидатов, определяющих развитие стресс-чувствительной гипертонической болезни у крыс линии НИСАГ (Глава 3.3.) Данный раздел диссертации завершается обсуждением результатов раздела 3.3, *однако, общее обсуждение результатов в форме «Заключение по диссертации» отсутствует.*

Рассмотрим более подробно основные результаты, полученные соискателем по каждому из направлений.

Генетическое картирование (QTL анализ) позволило в масштабе всего генома крыс НИСАГ выявить локусы, ассоциированные как с уровнем артериального давления в покое/стрессе, так и с вторичными признаками, ассоциированными с развитием гипертензии: вес тела, абсолютный и относительный вес органов-мишеней, уровень кортикостерона в крови в покое/стрессе. Следует отметить, что многие генетические локусы были определены соискателем впервые. Интересно, что генетический контроль уровня артериального давления и связанных с ним признаков у модельных животных менялся с возрастом. Так, в возрасте 3-4 мес. резкое повышение артериального давления в ответ на рестрикционный стресс, ассоциировалось с генетическими локусами на хромосомах 11, 15 и X, а для 6-мес. крыс НИСАГ гипертензивный статус характеризовался наличием локусов в дистальной части хромосомы 1, для которых были найдены статистически высокодостоверные ассоциации с уровнем артериального давления в покое/стрессе. *В связи с этим возникает вопрос: найденные различия связаны с изменениями с возрастом генетических механизмов, лежащих в основе гипертонической болезни у крыс НИСАГ? Можно ли говорить, что развитие гипертонического статуса у модельных животных на разных этапах развития заболевания контролируется/опосредуется разными участками генома и как можно объяснить такие изменения.*

Интересные результаты были получены при проведении QTL анализа геномов гибридов F_2 (НИСАГ×WAG), в котором был показан эффект аллелей

на изменчивость тестируемого признака. Наличие аллелей QTLs линии НИСАГ оказывало как положительное (увеличивало), так и отрицательное (уменьшало) влияние на признак, причем, для разных локусов и разных признаков этот эффект был разнонаправленным: либо аддитивным, либо доминантным, либо рецессивным. Таким образом, в результате проведенного исследования, Рединой О.Е. удалось обнаружить возрастные различия в генетическом контроле гипертонической болезни, найти новые генетические локусы, ассоциированные с развитием гипертонии у крыс линии НИСАГ, показать, что существуют общие локусы, в которых признаки «вес органов-мишеней» служат вспомогательным фенотипом для определения генов-кандидатов для признака артериального давления, что объясняет наличие генетического сцепления величин артериального давления с признаками «изменения веса органов-мишеней», сопровождающих развитие гипертонии у крыс НИСАГ.

Анализ транскриптомов (Глава 3.2.) крыс НИСАГ и WAG в возрасте 3 мес. - это самый большой раздел Главы 3. В этом разделе представлены результаты глубокого секвенирования транскриптомов двух отделов мозга (ствол мозга и гипоталамус), надпочечника и почки - органов крысы, отвечающих за регуляцию артериального давления и являющихся эффекторными звеньями и/или мишенями при развитии гипертензии. В каждом из проанализированных транскриптомов было обнаружено большое количество дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ) (от 139 в гипоталамусе до 960 в мозговом веществе почек), среди которых были обнаружены ДЭГ, ассоциированные с гипертензией: 22 в стволе мозга, 18 в гипоталамусе, 76 в надпочечниках, 44 в корковом и 62 - в мозговом веществе почек. Кроме того, в каждом из органов/тканей были обнаружены ДЭГ, связанные с заболеваниями центральной нервной системы (мозг, гипоталамус), инсулинорезистентностью, диабетической нефропатией, заболеваниями иммунной системы; с развитием нефросклероза и т.д. Во всех проанализированных органах/тканях функциональная аннотация ДЭГ выявила группы генов, ассоциированные с циркуляцией крови, с регуляцией уровня артериального давления, с изменениями гормонального статуса животных, а также с ответом на различные стимулы и стрессовые воздействия, указала и на высокую значимость иммунных процессов при формировании межлинейных различий у крыс НИСАГ и WAG. С помощью базы данных KEGG были определены метаболические пути, к которым относятся ДЭГ. Этот анализ показал, что ДЭГ относятся к регуляции гормональных процессов, контролю клеточной адгезии, к воспалительным и иммунным процессам, а также к ряду других метаболических путей. Сопоставление полученных результатов с известными литературными данными позволил соискателю предположить, что ДЭГ, с одной стороны, определяют гипертензивный статус животных и патологические изменения

во внутренних органах, являющиеся следствием гипертонии, с другой стороны, другая группа ДЭГ определяет компенсаторное действие и направлены на восстановление гомеостаза и преодоление последствий гипертонии.

К сожалению, этот раздел диссертации О.Е. Рединой не лишен недостатков, к которым следует отнести: 1) перегруженность таблицами, содержащими результаты секвенирования и аннотации в базах Gene Ontology и KEGG, 2) отсутствие скорирования (Score) результатов секвенирования не только по достоверности, но и по уровню изменения экспрессии. Если бы диссертант расположила ДЭГ в зависимости от изменения экспрессии (Fold change, данные есть в таблицах), что позволило бы сразу определить ДЭГ, вносящие основной вклад в развитие гипертензивного статуса крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивными крысами WAG, например, Top 10 или Top 25, избежать бесконечного описания генов, имеющих отношение к развитию гипертонии, но характеризующихся небольшими отличиями в уровне экспрессии, то такой анализ позволил бы автору сосредоточиться на описании общих и различающихся между органами/тканями ДЭГ, имеющими наибольшие различия в экспрессии.

Раздел 3.3 Главы 3, озаглавленный «Определение генов-кандидатов», представляет наибольший интерес в плане комплексного генетического профилирования гипертонической болезни, так как в этом разделе проводится сопоставление результатов QTL-анализа, данных глубокого секвенирования, а также анализ нуклеотидных замен (SNPs) в последовательности мРНК генов-кандидатов, определение генов-кандидатов на основании оценки их вклада в межлинейные различия. Наиболее интересным, с моей точки зрения, является раздел Главы 3.3, в котором Ольга Евгеньевна проводит определение генов-кандидатов на основании сопоставления данных по ДЭГ во всех изученных органах/тканях. Среди обнаруженных 13 общих ДЭГ, характеризующихся однонаправленным (либо во всех уровень экспрессии увеличен, либо во всех органах уменьшен) изменением уровней экспрессии и близкими значениями Fold change между разными органами/тканями. Среди 13 общих ДЭГ только ген *Ephx2*, кодирующий sEH растворимую эпоксидгидролазу, ассоциирован с развитием гипертонии и экспрессия именно этого гена характеризовалась наибольшим (от 10 до 18 раз) повышением. Кроме того, ген *Ephx2* является геном, дающим максимальный вклад в межлинейные различия между крысами НИСАГ и WAG во всех проанализированных органах/тканях. Интересно, что растворимая эпоксидгидролаза sEH катаболизирует эпоксиэйкозатриеновые кислоты, которые, синтезируясь в сосудистой эндотелии, способствуют релаксации сосудов, участвуют в процессе нейрогенного контроля мозгового кровотока и оказывают противовоспалительное действие, что защищает

сосуды от повреждений при развитии почечных и сердечно-сосудистых заболеваний. Таким образом, полученные результаты однозначно показывают, что ген *Erx2* является одним из наиболее перспективных для дальнейшего изучения возможности его использования в качестве мишени для фармакологического воздействия, направленного на профилактику или лечение стресс-ассоциированной гипертонии.

Отдельно хочется отметить результаты О.Е. Рединой, показывающие что генотип крыс НИСАГ значительно отличается от генотипов крыс других гипертензивных линий. Эти результаты позволили соискателю заключить, что «разные формы артериальной гипертонии, воспроизводимые на всех известных генетических моделях крыс, характеризуются наличием специфических молекулярно-генетических механизмов развития их гипертензивного статуса, что характеризует артериальную гипертонию как генетически гетерогенное заболевание, не имеющее единой этиологии, и диктует необходимость разработки персонализированного подхода к диагностике, лечению и профилактике гипертонической болезни в клинике.»

Автореферат диссертационной работы О.Е. Рединой и 29 работ (23 из них опубликованы в журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science), опубликованных в журналах и сборниках, адекватно отражают содержание диссертационной работы О.Е. Рединой. Кроме того, результаты работы были представлены на 35 российских и международных конференциях, включая четыре международных конференции, посвященные только проблемам, связанным с артериальной гипертонией.

В целом можно заключить, что соискателем проделана огромная экспериментальная работа, направленная на выяснение генетических механизмов, лежащих в основе развития стресс-зависимой гипертонии, на модели крысы линии НИСАГ. Особенно импонирует то, что О.Е. Редина провела анализ генотипов не только крыс линии НИСАГ в сравнении с нормотензивной линией WAG, но и 12 других линий/сублиний гипертензивных крыс, что позволило значительно повысить важность сделанных выводов.

При чтении диссертационной работы О.Е. Рединой, тем не менее, **появился ряд замечаний, вопросов и комментариев, которые уже были упомянуты в тексте отзыва, а здесь я приведу их все вместе для удобства.**

1. Обзор литературы (разделы с 1.1 – 1.11) дают общее представление о физиологических аспектах регуляции артериального давления, однако, эта часть обзора мало связана с темой диссертации и с, собственно, генетическим профилированием при гипертонической болезни.

2. При описании существующих в мире моделей гипертонической болезни также больше внимания уделено физиологическим нарушениям,

повреждению внутренних органов при развитии того или иного типа гипертонии, какое-либо упоминание известных (или неизвестных) генетических аспектов развития гипертонии на этих моделях автором не приведено.

3. Разделы обзора 1.13-1.17. напрямую связанные с темой диссертации. написаны очень кратко (около 20 стр.), поэтому вызывает сожаление, что работы, наиболее близкие теме диссертации, процитированы недостаточно подробно..

4. Можно ли сказать, что найденные О.Е. Рединой изменения генетического контроля с возрастом животных связаны с изменениями в процессе старения генетических механизмов, лежащих в основе гипертонической болезни у крыс НИСАГ? Можно ли говорить, что развитие гипертонического статуса у модельных животных на разных этапах развития заболевания контролируется/опосредуется разными участками генома и как можно объяснить такие изменения.

5. Глава 3.2. перегружена таблицами, содержащими результаты секвенирования и аннотации в базах Gene Ontology и KEGG. В таблицах отсутствует ранжирование (скорирования, Score) результатов секвенирования по уровню изменения экспрессии. Если бы диссертант расположила ДЭГ в зависимости от изменения их экспрессии (Fold change, данные есть в таблицах), это позволило бы сразу определить ДЭГ, вносящие основной вклад в развитие гипертонического статуса крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивными крысами WAG, например, Top 10 или Top 25, избежать бесконечного описания генов, имеющих отношение к развитию гипертонии, но характеризующихся небольшими отличиями в уровне экспрессии. Такой анализ позволил бы автору сосредоточиться на описании общих и различающихся между органами/тканями ДЭГ, имеющими наибольшие различия в экспрессии.

8. Вызывает сожаление, что диссертант не проанализировал биоинформатическими методами ДЭГ, вносящие наибольший вклад в гипертонический статус крыс НИСАГ с точки зрения их участия в путях передачи внутриклеточных и межклеточных сигналов (Pathway analysis, signal transduction), что позволило бы представить более четкую картину генетического контроля стресс-чувствительной гипертонии у крыс НИСАГ.

7. В диссертации отсутствует общее обсуждение результатов в форме «Заключение по диссертации».

Приведенные вопросы и замечания носят в основном дискуссионный характер и не снижают моей высокой оценки диссертационной работы О.Е. Рединой.

Заключение

Диссертационная работа Рединой Ольги Евгеньевны «Комплексное генетическое профилирование гипертонической болезни на модели стресс-чувствительной артериальной гипертонии - крысах линии НИСАГ», представленная на соискание степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.07 - генетика, является законченной научно-исследовательской работой, в которой автором получены новые оригинальные данные о генетических механизмах, лежащих в основе развития стресс-чувствительной гипертонической болезни и выявлены гены, которые можно рассматривать как перспективные мишени для создания новых гипотензивных лекарственных средств. По актуальности, новизне, научной и практической значимости, методологическому и методическому уровню диссертация О.Е. Рединой полностью соответствует критериям пп.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора, а ее автор Ольга Евгеньевна Редина заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Зенкова Марина Аркадьевна

Доктор биологических наук, профессор,
Заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

Адрес: Новосибирск, 630090, Проспект им. акад. Лаврентьева, 8.

Для телеграмм: Новосибирск 90, ИХБФМ СО РАН

Телефон: (383)3635161. Факс: (383)3635153

E-mail: marzen@niboch.nsc.ru

Согласна на включение в аттестационное дело и дальнейшую обработку моих персональных данных.

Подпись М.А. Зенковой заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН

к.х.н.



П.Е. Пестряков