

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Айдагуловой Светланы Владимировны
на диссертацию Телегиной Дарьи Викторовны
«Молекулярные механизмы гибели клеток в сетчатке крыс
при старении и развитии ретинопатии», представленную в Совет Д 003.011.01
при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы диссертационного исследования. Регенерация и гибель клетки характеризуют ее как единицу живой материи и являются одними из основных фундаментальных вопросов, изучаемых как в рамках клеточной биологии, гистологии, цитологии, так и в области смежных дисциплин. Современные методы исследования структуры тканей и клеток позволяют изучать физиологические и патологические процессы как последовательность молекулярных событий, открывая новые перспективные направления в биотехнологии и медицине, в т.ч. с поиском новых мишеней для таргетной терапии. Цель диссертационного исследования Телегиной Дарьи Викторовны - изучить механизмы клеточной гибели в сетчатке при старении и при развитии у крыс OXYS ретинопатии, аналогичной возрастной макулярной дегенерации.

В связи с увеличением средней продолжительности жизни в развитых странах и другими факторами, возраст-ассоциированная макулярная дегенерация является одной из ведущих диагностированных причин потери зрения у почти 50 миллионов пожилых пациентов, но реальные масштабы поражения, по оценкам экспертов, достигают 198 миллионов человек при отсутствии специфической, или этиопатогенетической, терапии. Являясь нейродегенеративным процессом и «болезнью старения», макулодегенерация все больше поражает трудоспособное население с биологическим эффектом «ускорения старения», что является и фундаментальной, и медико-социальной проблемой.

Трудности получения клинического материала для исследования макулярной дегенерации компенсированы возможностью изучения ее экспериментальной модели – ретинопатии у крыс линии OXYS, созданной в Институте цитологии и генетики путем селекции крыс Вистар, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы. Эта линия явилась блестящей моделью ускоренного старения и

патологии не только органа зрения, но и многих других висцеральных органов и систем, результаты исследования которых нашли свое заслуженное признание в нашей стране и за рубежом. Таким образом, тема кандидатской диссертации Д.В.Телегиной актуальна, и сама работа ожидаема как очередной этап изучения старения с помощью уникальной линии лабораторных животных и с точки зрения фундаментальной науки, и с большим потенциалом практического применения результатов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Научно-исследовательская работа Д.В. Телегиной, поддержанная грантом РФФИ № 15-04-02195 А, выполнена на базе высоких научных достижений сотрудников сектора молекулярных механизмов старения Института цитологии и генетики СО РАН. Проведено отвечающее мировым стандартам исследование процессов старения и процессов клеточной гибели на молекулярно-клеточном уровне.

Результаты получены с помощью высококлассной приборной базы и реактивов ведущих фирм-производителей, что подробно отражено в разделе «Материалы и методы». Использовано 118 крыс-самцов OXYS и Вистар (контроль) в возрасте 20 сут, 3, 7 и 18 мес. Эти сроки выбраны неслучайно, т.к. к 20-м суткам заканчивается период созревания сетчатки, возраст 3 мес – период манифестации «клинических» признаков ретинопатии у крыс OXYS, возрасту 18 мес соответствует период активной прогрессии заболевания, что адекватно поставленным цели и задачам диссертационного исследования.

Выполнено массовое параллельное секвенирование РНК (RNA-seq) на платформе Illumina GAIIx (ОАО «Геноаналитика») с последующим биоинформатическим анализом данных. Создан список генов-регуляторов апоптоза, экспрессия которых в сетчатке крыс OXYS и Вистар различна. Анализированы результаты исследования транскриптома сетчатки крыс OXYS и Вистар методом RNA-seq: для возраста 3 и 18 месяцев, выполненного ранее в научном коллективе диссертанта, для 20-дневных животных – полученные в настоящей работе (по 3 животных для каждого возраста и линии). Это позволило выполнить реконструкцию и анализ ассоциативных сетей. Создан список генов-регуляторов клеточной гибели, экспрессия которых в сетчатке крыс OXYS и Вистар изменяется с возрастом.

Наряду с этим, использована иммунофлуоресцентная микроскопия криосрезов сетчатки (5 первичных антител) и TUNEL-окрашивание. Сканирующая конфокальная микроскопия ретинального пигментного эпителия с подлежащей сосудистой оболочкой. Вестерн-блот анализ с использованием антител к глиальному фибриллярному кислому протеину (GFAP) и β -актину и оценкой интенсивности свечения с помощью программы ImageJ (NIH, Bethesda, MD). Иммуноферментный анализ ELISA содержания индуцибельной синтазы оксида азота iNOS в сетчатке животных в возрасте 3 и 18 мес. Выделение тотальной РНК из замороженной ткани сетчатки крыс и RT-PCR для оценки изменения экспрессии генов nNOS, iNOS и eNOS.

Выполнен адекватный статистический анализ результатов. Все результаты и выводы диссертационного исследования прекрасно проиллюстрированы и профессионально проанализированы автором с учетом современных научных данных за последние пять лет, содержащихся в литобзоре, что полностью убеждает в достоверности полученных новых знаний.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Принципиально новыми являются положения и выводы диссертации, раскрывающие клеточные и молекулярные механизмы ретинопатии у крыс линии OXYS, воспроизводящей возраст-ассоциированную макулярную дегенерацию. Получено большое количество новых данных, из них заслуживают особого внимания следующие.

На доклинической стадии ретинопатии, в возрасте 20 сут, в сетчатке крыс OXYS изменен уровень экспрессии 245 генов, основная часть которых связана с процессами развития, сигнальной трансдукцией и клеточной дифференцировкой. Наиболее существенно изменены уровни мРНК генов Tmem221 – интегрального компонента мембраны, трансмембранного белка 221 (Fold Change > 75) и GSTA6 - глутатион-S-трансферазы A6 (Fold Change > 70), регулирующего конъюгацию сульфгидрильной (SH₂) группы с электрофильными атомами C, N, S, O молекул ксенобиотиков. Также выявлено значительное снижение экспрессии генов, кодирующих субъединицы дыхательной цепи митохондрий: mt-ND4, mt-ND5, mt-ND4L (комплекс I, НАДН/убихинон оксидоредуктаза), Atp5f1 (Комплекс V, АТФ-синтаза).

Гибель клеток в сетчатке крыс OXYS реализуется как путем апоптоза, так и

некроза и аутофагии, при этом наибольшие изменения экспрессии генов-регуляторов клеточной гибели происходят в период развития «клинических» признаков ретинопатии – с возраста 20 сут до 3-х мес. Максимальная активность гибели клеток приходится на возраст 20 сут – период, когда завершается созревание сетчатки.

По данным сравнительного анализа транскриптома сетчатки крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 сут, 3 и 18 мес, общие термины генных онтологий для дифференциально экспрессирующихся генов крыс OXYS относительно крыс Вистар обнаружены для возраста 20 сут и 3 мес (ответ на гормональные стимулы) и для 20-суточных и 18-месячных крыс (организация внеклеточного матрикса).

По данным иммуногистохимического анализа продуктов генов-регуляторов некроптоза RIPK1 и RIPK3 на криосрезах сетчатки животных в возрасте 20 дней, 3, и 18 мес, впервые установлены их возраст-зависимые различия. Так, экспрессия белка RIPK1 усиливалась с возрастом в сетчатке крыс OXYS и Вистар в фоторецепторном слое, начиная с возраста 20 дней, а также ганглионарном слое у крыс линии OXYS (с 3 до 18 мес) и Вистар (в возрасте 18 мес). Локализация белка RIPK3 выявлена в ганглионарном слое у крыс линии OXYS с возраста 3 мес, у крыс Вистар - только в возрасте 18 мес. Эти различия свидетельствуют об ускоренной гибели путем некроптоза клеток ганглионарного слоя сетчатки у крыс линии OXYS.

С помощью сканирующей конфокальной микроскопии показано, что у крыс обеих линий с возрастом постепенно снижается плотность ретинального пигментного эпителия, но только у крыс OXYS в возрасте 3 мес происходит резкое уменьшение плотности клеток - почти на 41% по сравнению с 20-дневными животными, что соответствует уровню плотности клеток ретинального пигментного эпителия у 18-месячных крыс Вистар, и в этом возрасте обнаружены достоверные межлинейные различия ($p < 0,05$). То есть развитие ретинопатии у крыс OXYS происходит на фоне деструктивных изменений и нарушения способности к пролиферации клеток ретинального пигментного эпителия.

Активная прогрессия ретинопатии у крыс линии OXYS происходит на фоне фагоцитарной дисфункции клеток микроглии и макрофагальной активации астроцитов и клеток Мюллера. При этом впервые оценены возрастные изменения распределения активированных макрофагов и микроглии в различных слоях

сетчатки крыс Вистар и OXYS.

В целом, диссертация представляет собой завершенное оригинальное научное исследование, соответствующее паспорту специальности «03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология» почти во всех разделах, а именно: 1. Изучение закономерностей цито- и гистогенеза, строения и функции клеток и тканей; 2. Изучение закономерностей дифференцировки клеток и тканей, их физиологической регенерации и регуляции этих процессов; 5. Исследование адаптации тканевых элементов к действию различных биологических, физических, химических и других факторов; 6. Молекулярные, иммунологические и физиологические аспекты изучения клеток многоклеточных организмов в норме и патологии; а также пункт 7. в части «разработка экспериментальных моделей».

Качество оформления диссертационного исследования Д.В. Телегиной соответствует самым высоким стандартам представления результатов научно-исследовательских работ. В структуре диссертации имеются введение, детальный литературный обзор, подробное описание материалов и методов, глава с результатами собственных исследований (11 подглав), обсуждение результатов, заключение, выводы и список литературы. При оформлении рукописи выполнены требования ГОСТов; иллюстративный материал высокого качества, что способствует презентативности полученных данных.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научных изданиях. Положения диссертационной работы Д.В. Телегиной полностью опубликованы в 4 периодических рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК РФ для публикации материалов кандидатских диссертаций, в т.ч. в 2 международных рецензируемых научных журналах с высоким импакт-фактором.

Значимость для науки и практики результатов диссертации соискателя и возможность конкретных путей их использования. Представлен гистогенез и молекулярно-клеточные особенности генетически-обусловленной ретинопатии у крыс OXYS, в развитии которой являются первичными нарушения пролиферации клеток ретинального пигментного эпителия и его рано манифестирующие деструктивные изменения, сопровождающиеся снижением врожденного иммунитета, характерным для этой линии экспериментальных животных. При прогрессировании ретинопатии нарастает выраженность атрофических изменений

клеток сетчатки в сочетании с реактивным глиозом при отсутствии миграции микроглии и макрофагов в слой фоторецепторов. Эти результаты наиболее полно соответствуют возраст-зависимым изменениям сетчатки при сухой форме макулярной дегенерации у пациентов, поэтому ретинопатию у крыс OXYS следует использовать как наиболее адекватную экспериментальную модель данной патологии.

Положительные и отрицательные стороны работы. Диссертация заслуживает самой высокой оценки по замыслу, воплощению и представлению собственных результатов. Принципиальных замечаний к диссертации и автореферату, полно отражающему содержание работы, нет.

К Д.В. Телегиной имеется несколько блоков вопросов. Первый: проводилось ли обзорное гистологическое исследование парафиновых срезов сетчатки, и приходилось ли видеть липофусциновые друзы под пигментным эпителием? (Автором были найдены гранулы липофусцина «в некоторых клетках», а не под ними?) Если они выявлялись, то с какого возраста?

Далее: ретинопатия у крыс линии OXYS соответствует сухой стадии возраст-ассоциированной макулярной дегенерации. Можно ли утверждать, что экспериментальная модель полностью воспроизводит патогенез макулярной дегенерации в ее естественном течении: сначала атрофическая, или «сухая», стадия; затем неоваскуляризация (влажная макулярная дегенерация)? Можно ли предполагать, что у крыс OXYS старше 18 мес развилась бы ретинопатия с индукцией пролиферации эндотелия? Интересно отметить, что есть ссылка о развитии влажной ретинопатии у 10-15% крыс линии OXYS, причем такие же данные приводят и для пациентов с возраст-ассоциированной макулярной дегенерацией.

Третий вопрос. Из «научной новизны»: «Уровень мРНК генов-регуляторов клеточной гибели как у крыс OXYS, так и у крыс Вистар изменяется только в возрастной период с 20 сут до 3 мес, при этом у крыс обеих линий наибольшая активность гибели клеток путем апоптоза приходится на возраст 20 сут – период завершения созревания сетчатки». Далее, в «результатах»: «Среди генов, экспрессия которых изменилась в возрастной период от 3 до 18 мес, генов, регулирующих апоптоз, не выявлено». Нельзя ли рассматривать это явление как нормальный морфогенез сетчатки?

Четвертый вопрос. До выполнения работы был неизвестен ответ на вопрос: «Каковы молекулярные пути гибели фоторецепторов: апоптоз, некроз или аутофагия?». Реконструкция и анализ генных онтологий ассоциативных генных сетей показали, что развитие ретинопатии у крыс OXYS во всех изученных возрастах ассоциировано с изменениями в экспрессии генов, регулирующих внешний путь апоптоза. Так именно апоптоз является ведущим механизмом клеточной гибели?

В дискуссионном плане можно отметить доминирование акцентов «гибели клеток». В большинстве случаев процессы повреждения и/или гибели клеток всегда рассматривают как несомненный урон, или патологию, не придавая должного значения механизмам компенсации. Именно в них, наиболее вероятно, и заложены пути профилактики и коррекции отличного от условной нормы уровня экспрессии определенных генов.

Заключение о соответствии диссертации требованиям Положения о присуждении ученых степеней. Диссертационное исследование Телегиной Дарьи Викторовны «Молекулярные механизмы гибели клеток в сетчатке крыс при старении и развитии ретинопатии», выполненное под руководством доктора биологических наук, профессора Наталии Гориславовны Колосовой, является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, проведенной на высоком научно-методическом уровне, в которой получен фактический материал и содержится решение научной задачи – изучено изменение экспрессии генов, ассоциированных с процессами развития, сигнальной трансдукцией и клеточной дифференцировкой, со вкладом в реализацию различных механизмов клеточной гибели при старении и развитии ретинопатии, что имеет существенное значение для клеточной биологии, цитологии, гистологии.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в глубоком фундаментальном обосновании соответствия линии крыс OXYS критериям модели возрастной макулярной дегенерации, что открывает новые возможности для исследования механизмов патогенеза заболевания, для разработки и оценки эффективности новых способов его лечения и профилактики.

Диссертационное исследование по актуальности, методическому уровню, значимости полученных результатов и выводов, количеству публикаций в рецензируемых периодических научных изданиях отвечает требованиям п. 9

«Положения о присуждении ученых степеней» (утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, и соискатель Телегина Дарья Викторовна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

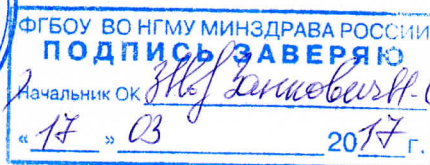
Официальный оппонент

Заведующий лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции ЦНИЛ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России доктор биологических наук (03.03.04), профессор по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология



Айдагулова Светлана Владимировна

17 марта 2017 г.



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; 630091, Новосибирск, Красный проспект, 52, тел. +7(383)2223204; rectorngmu@yandex.ru