



**МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
(МГУ)**

Ленинские горы, Москва,
ГСП-1, 119991
Телефон: 939-10-00
Факс: 939-01-26

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор МГУ имени М.В. Ломоносова,
начальник Управления научной политики
и организации научных исследований,
профессор, д.ф.м.н.
А.А. Федянин



А.А. Федянин

2017 г.

09.03.2017 № 343-14/013-03

На № _____

ОТЗЫВ

ведущей организации – ФГБУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» - о диссертационной работе Д.В.Телегиной на тему **«Молекулярные механизмы гибели клеток в сетчатке крыс при старении и развитии ретинопатии»**, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Д.В. Телегиной продолжает цикл работ по изучению патогенеза возрастной макулярной дегенерации (ВМД) на модели преждевременно стареющих крыс OXYS. ВМД - комплексное, многофакторное заболевание глаз, которое становится основной причиной необратимой потери зрения людьми старше 60 лет. Заболеваемость ВМД растет на фоне увеличения продолжительности жизни. По прогнозам, количество страдающих ВМД людей к 2020 году вырастет на треть. Патогенез и этиология ВМД до конца не ясны, эффективных способов лечения и профилактики нет. В основе патогенеза ВМД лежат характерные для старения изменения сетчатки, но механизмы, запускающие переход обусловленных возрастом изменений в патологический процесс, не известны. Также не ясны молекулярно-генетические предпосылки событий, ведущих к гибели фоторецепторов, и пути их гибели. В связи с этим изучение молекулярных механизмов гибели клеток при старении и развитии ВМД, а именно этой проблеме посвящена диссертационная работа Д.В. Телегиной, приобретает особую актуальность.

Научная новизна исследования

В последние годы для исследования молекулярно-генетических основ различных патологий всё большее использование находят экспериментальные модели заболеваний человека, созданные с использованием лабораторных животных. Модели позволяют более детально, чем это позволяет работа с человеком, исследовать причины возникновения и развития болезней, выявлять лежащие в их основе молекулярно-генетические предпосылки и механизмы, знание которых необходимо для разработки эффективных патогенетически обоснованных способов профилактики и лечения. Работа Д.В. Телегиной основана на исследовании уникальной модели – созданной ВИЦиГ СО РАН линии крыс OXYS, характеризующийся преждевременным старением и развитием ряда старческих заболеваний, в том числе ретинопатии, аналогичной ВМД у людей. Это в значительной степени определяет новизну и оригинальность диссертационной работы, и вклад в понимание фундаментальных механизмов старения и развития, связанных с ним заболеваний. Исследование крыс OXYS проводится в течение многих лет; предшественники соискателя получили и опубликовали множество ценных научных результатов. Оригинальность и принципиальную новизну диссертационной работы Д.В. Телегиной в значительной мере определило то, что она сосредоточилась на поиске молекулярно-генетических предпосылок развития у крыс OXYS ретинопатии, уделив в работе особое внимание исследованию доклинической стадии заболевания. Несомненное достоинство работы – использование классических цитологических и гистологических подходов в комплексе с биоинформатическими методами анализа секвенирования транскриптома для выявления изменений экспрессии генов, связанных с клеточной гибелью.

Достоверность и обоснованность научных результатов

Диссертация Д.В. Телегиной имеет традиционную структуру, изложена на 176 страницах машинописного текста, содержит 18 рисунков, 14 из которых – оригинальные, 3 таблицы и 4 приложения. Список литературы включает 256 источников.

Во «Введении» автор рассматривает актуальность и степень разработанности темы исследования, логично подводит к формулировке цели и задач. В этом вводном разделе Д.В. Телегина также останавливается на научной новизне работы, теоретической и практической значимости исследования, на положениях, выносимых на защиту, личном вкладе автора, приводит сведения об апробации работы и числе публикаций.

«Обзор литературы» представляет собой объемный (около 50 страниц), насыщенный информацией раздел диссертационной работы. Он состоит из пяти глав, в которых рассматривается комплекс проблем, связанных с темой

диссертации: патогенез возрастной макулярной дегенерации; современные представления о молекулярных механизмах апоптоза, некроза и аутофагии и их роли в возрастных изменениях сетчатки и развитии ВМД; изменения глиальных клеток сетчатки (астроцитов, клеток Мюллера и микроглии) при физиологическом старении и при развитии патологии. Все положения «Обзора литературы» подкреплены многочисленными ссылками на оригинальные работы различных авторов.

Раздел «Материалы и методы» написан подробно, с указанием всех необходимых деталей использованных подходов. Научная проблема, исследованию которой посвящена диссертационная работа Д. В. Телегиной, лежит на стыке нескольких областей науки: клеточной биологии, молекулярной биологии, физиологии. Закономерно, автором использован набор разнообразных современных методов, в том числе биоинформатических. Такой комплексный подход к решению поставленных задач, безусловно, заслуживает высокой оценки.

Раздел «Результаты» состоит из 11 подразделов и посвящен: исследованию изменения транскриптома сетчатки крыс OXYS на доклинической стадии развития ретинопатии, анализу вклада различных типов клеточной гибели в развитие ретинопатии у крыс OXYS и исследованию изменения ретинального пигментного эпителия и глии при старении и развитии ретинопатии.

Глава 3.1 посвящена анализу данных массового параллельного секвенирования транскриптома сетчатки крыс линии OXYS в возрасте 20 дней – на доклинической стадии развития ретинопатии. Данный метод позволил выявить изменения уровня экспрессии множества генов, которые предположительно связаны с развитием ретинопатии. Принципиально важным результатом этого анализа – развитию клинических признаков ретинопатии у крыс OXYS предшествуют изменения экспрессии генов, ассоциированных с процессами развития, сигнальной трансдукцией и клеточной дифференцировкой.

В главах 3.2 – 3.6 рассматриваются изменения экспрессии с возрастом и при развитии ретинопатии генов, ассоциированных с разными типами клеточной гибели (апоптозом, аутофагией и программируемым некрозом). В данном разделе автор сравнивает свои результаты исследования транскриптома сетчатки крыс OXYS и Вистар с таковыми, полученными в секторе ранее для других крыс на разных стадиях развития ретинопатии. Такой подход обеспечивает более полную картину изменения экспрессии генов, вовлеченных в апоптоз, аутофагию и некроз. Работа выигрывает от того, что автор использует комбинацию биоинформатических методов для анализа транскриптома и выявления генов, вовлеченных в разные типы клеточной гибели, в том числе анализ генных сетей, а также ряд гистологических исследований.

Соискателю удалось охарактеризовать изменения экспрессии генов, вовлеченных к клеточную гибель, с возрастом и при развитии ретинопатии и выявить их общую закономерность: наибольшие изменения экспрессии генов, связанных с клеточной гибелью, предшествуют проявлениям клинических

признаков ретинопатии. Кроме того, используя иммунофлуоресцентный анализ, автор показал, что активность апоптоза в сетчатке в возрасте 20 дней существенно выше, чем в 3 и 18 мес у крыс обеих линий, при этом у крыс OXYS количество апоптотических клеток больше, чем у Вистар. Кроме того, у крыс OXYS при развитии ретинопатии наблюдается флуоресцентное свечение маркеров программируемого некроза в ганглионарном слое. Это серьезный и важный этап исследования патогенеза ретинопатии у крыс OXYS, который удалось успешно завершить.

Главы с 3.7 по 3.9 посвящены исследованию морфофункциональных изменений ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и глиальных клеток в сетчатке с возрастом и при развитии ретинопатии. Используя лазерную сканирующую конфокальную микроскопию, соискатель провел исследование плотности клеток РПЭ, что позволило сделать важный вывод: патологические процессы в сетчатке крыс OXYS развиваются на фоне атрофических изменений клеток РПЭ – нарушения их способности делению и пролиферации, которое предшествует манифестации ретинопатии. С помощью иммунофлуоресцентного анализа ряда маркеров глиальных клеток сетчатки (микроглии, астроцитов и клеток Мюллера) соискатель показал, что манифестация ретинопатии у крыс OXYS протекает на фоне фагоцитарной дисфункции и снижения элиминации погибших клеток, на что указывает отсутствие характерной для ВМД миграции макрофагов и микроглии в фоторецепторный слой сетчатки. Этот феномен, по мнению автора, обусловлен неполноценной реакцией иммунной системы. Кроме того, автором показана активация клеток Мюллера и астроцитов в возрасте 7 и 18 месяцев у крыс OXYS – в период активной прогрессии заболевания.

В главах 3.10 и 3.11 приведены результаты анализа изменения экспрессии синтаз оксида азота, согласно которым манифестация и прогрессия ретинопатии у крыс OXYS происходят на фоне снижения уровня мРНК и белка индуцибельной NOS, которое отражает характерное для крыс OXYS снижение реактивности иммунной системы.

В целом экспериментальная часть диссертационной работы производит впечатление солидного исследования, итоги которого грамотно подведены в разделах «Обсуждение результатов» и «Заключение» подводят итог проведенной работы.

Выводы диссертации обоснованы, соответствуют задачам исследования и полученным результатам. По теме диссертации было опубликовано 8 работ, в том числе - 4 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК, две из них - в престижных международных изданиях. Результаты, полученные в работе, были представлены на 4 международных конференциях. Автореферат соответствует основным положениям диссертации и в полном объеме отражает ее содержание.

Принципиальных замечаний по работе нет. В то же время следует отметить отсутствие четкого обоснования в обзоре литературы проведения построения генных сетей, реконструкция которых явилась одной из задач исследования. Кроме

того, в обсуждении автор уделяет внимание mTOR-сигнальному пути, изменения экспрессии генов которого при анализе транскриптома не оценивались. Эти замечания не являются критичными и не снижают высокого уровня работы в целом.

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

Диссертационная работа Д.В. Телегиной является законченным, актуальным, оригинальным исследованием, выполненным на высоком научном и методическом уровне. Результаты исследования существенно дополняют фундаментальные знания об изменениях транскриптома сетчатки с возрастом и на ранних доклинических стадиях ретинопатии, аналогичной ВМД у людей, расширяют представления о патогенезе заболевания и возможных молекулярно-генетических предпосылках его развития. Результаты работы могут быть использованы в образовательных курсах по генетике, физиологии и нейробиологии, а также в научно-исследовательской работе Институтов и Университетов биологического и медицинского профиля. Работа имеет также большую практическую перспективу. Новые данные об особенностях изменения экспрессии генов-регуляторов клеточной гибели при нормальном старении и при развитии ретинопатии, об изменениях с возрастом глиальных клеток сетчатки, а также об изменениях клеток РПЭ на разных стадиях ретинопатии могут быть полезны при выборе потенциальных терапевтических мишеней при создании новых препаратов, направленных на профилактику и лечение ВМД у людей.

Диссертация Д.В. Телегиной соответствует пунктам 9-10 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», отвечает требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно положению «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденному постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., а её автор, Телегина Дарья Викторовна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре отдела биоэнергетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова 16 февраля 2017 г, протокол № 381.

Председатель семинара
академик РАН



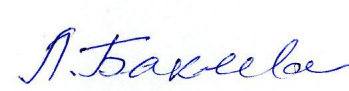
В.П. Скулачев

Заместитель по научной работе
академик РАН



А.А. Богданов

Отзыв подготовила
профессор, доктор биологических наук



Л.Е. Бакеева