

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук профессора Рябчиковой Елены Ивановны на диссертационную работу Телегиной Дарьи Викторовны «Молекулярные механизмы гибели клеток в сетчатке крыс при старении и развитии ретинопатии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

**Актуальность исследования.** Достижения современной медицины и офтальмологии, в частности, поражают, однако до сих пор существуют заболевания, не поддающиеся лечению, и среди них - возрастная макулярная дегенерация (ВМД), уже 30 лет занимающая первое место среди заболеваний, ведущих к потере зрения. Исследования последних лет показывают, что в странах северной Европы ежегодно ожидаются 6100 новых случаев обнаружения ВМД на поздних стадиях и 605 случаев слепоты на миллион жителей. В России заболеваемость ВМД составляет более 15 случаев на 1000 населения, каждый 20-й россиянин находится под угрозой этого приводящего к слепоте заболевания. Очевидно, что с ростом продолжительности жизни эти показатели возрастут (по прогнозам ВОЗ в 2025 году в мире будет насчитываться 1,2 миллиарда человек старше 60 лет). Вместе с тем, информированность общества о существовании ВМД, рисках её развития, и мерах профилактики недостаточна, и полагают, что в РФ количество пациентов с ВМД может достигнуть 4 миллионов человек уже в ближайшие 5 лет. В связи с вышесказанным очевидна необходимость разработки средств ранней диагностики, основанных на достижениях современной молекулярной медицины и биологии, однако, молекулярные механизмы развития ВМД исследованы недостаточно.

Природа органа зрения жестко ограничивает возможности его изучения у людей, и применение адекватных экспериментальных моделей является крайне важным компонентом изучения ВМД, которая, по сути, является комплексным, многофакторным нейродегенеративным заболеванием. Вышеизложенное свидетельствует о **крайне высокой актуальности** диссертационного исследования Телегиной Д.В., направленного на изучение молекулярно-генетических характеристик событий, сопровождающих деструктивные изменения сетчатки крыс

OXYS, предоставляющих уникальную возможность изучения возрастных изменений глаза.

**Научная новизна** диссертационного исследования Телегиной Д.В. несомненна. Так, впервые исследован профиль экспрессии генов в сетчатке крыс Вистар и OXYS в возрасте 20 дней, когда не регистрируются клинические проявления ретинопатии. В сетчатке крыс OXYS выявлены изменения уровня мРНК 245 генов, в том числе связанных с процессами развития, сигнальной трансдукцией и дифференцировкой клеток. Впервые определены кластеры генов, вовлеченных в реализацию механизмов клеточной гибели (апоптоза, аутофагии и программируемого некроза). Впервые установлено, что уровень мРНК генов-регуляторов клеточной гибели как у крыс OXYS, так и у крыс Вистар, изменяется только в период с 20 дней до 3 мес., причём у крыс обеих линий гибель клеток путем апоптоза максимальная в возрасте 20 дней, в период завершения созревания сетчатки. Впервые с помощью иммунофлуоресцентного анализа определена локализация основных продуктов генов-регуляторов клеточной гибели в сетчатке. Впервые методами конфокальной микроскопии установлено, что у крыс OXYS развитие ретинопатии сопряжено с деструктивными изменениями клеток РПЭ, которые фиксируются в возрасте 20 дней, на доклинической стадии заболевания. Впервые изучена динамика деструктивных изменений различных клеток РПЭ и определены возрастные изменения локализации активированных макрофагов и микроглии в различных слоях сетчатки крыс Вистар и OXYS.

**Теоретическая и научно-практическая значимость работы.** Результаты диссертационного исследования Телегиной Д.В. вносят существенный вклад в фундаментальные знания об изменениях транскриптома сетчатки с возрастом и на ранних (доклинических) стадиях ретинопатии, моделирующей ВМД у людей, а также расширяют представления о патогенезе заболевания и возможных молекулярно-генетических предпосылках его развития. Полученные Телегиной Д.В. данные об особенностях изменения экспрессии генов-регуляторов клеточной гибели при нормальном старении и при развитии ретинопатии, о возрастных изменениях глиальных клеток сетчатки могут быть полезны при выборе терапевтических мишеней при разработке новых препаратов, направленных на профилактику и лечение ВМД у людей. Особую важность, на мой взгляд, имеют выявленные

изменения сетчатки на ранних стадиях, до клинических проявлений, которые могут послужить базой для поиска молекулярных маркеров ретинопатии. Учитывая сложность диагностики ВМД у людей, это направление работы требует дальнейшего развития в плане создания средств ранней диагностики ВМД.

**Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Основные результаты работы получены автором самостоятельно. Объем исследований и современный уровень использованных методов определяют достоверность полученных результатов, которая не вызывает сомнений. Выводы и заключения работы адекватны полученным результатам и в полной мере отражают существо проведенной работы.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (256 источников). Работа изложена на 176 страницах, содержит 18 рисунков, 3 таблицы и 4 приложения.

Во «Введении» Дарья Викторовна четко представляет актуальность исследования, из которой логически вытекают цель и задачи диссертационной работы, приводит сведения о научной новизне работы, теоретической и практической значимости.

Глава «Обзор литературы» дает достаточное представление о состоянии знаний, имеющих отношение к предмету диссертационной работы Дарьи Викторовны. В «Обзоре» приведены сведения о патогенезе ВМД, охватывающие его различные аспекты. Разделы «Молекулярный механизм апоптоза»; «Молекулярный механизм аутофагии» и «Молекулярный механизм программируемого некроза» сосредоточены на описании известных молекулярных событий, микроскопические характеристики процессов упоминаются вскользь, что вызывает сожаление, учитывая специальность, по которой защищается диссертационная работа. В «Обзоре литературы» Дарья Викторовна анализирует современные публикации, посвященные изучению роли апоптоза, аутофагии и некроптоза, а также роли различных глиальных клеток в патогенезе ВМД.

Несомненно, важным разделом «Обзора» является раздел «Крысы OXYS как модель ВМД», дающий полное представление о развитии данной

экспериментальной модели и её уникальности, позволяющей использовать крыс OXYS как для исследования молекулярно-генетических механизмов старения и развития, связанных с ним заболеваний, так и для объективной оценки новых способов их лечения и профилактики.

Глава «Материалы и методы» написана достаточно подробно, приводится описание всех использованных методов, которые адекватны поставленным задачам и полностью соответствуют современному уровню биологической науки.

Глава «Результаты» начинается с анализа транскриптома сетчатки крыс на доклинической стадии заболевания, в возрасте 20 дней, в период завершения постнатального созревания сетчатки у крыс, методом массового параллельного секвенирования. Автором выявлены изменения экспрессии 245 генов, включая гены, связанные с процессами развития, сигнальной трансдукцией и клеточной дифференцировкой у 20-дневных крыс OXYS. Эти данные, в совокупности с данными раздела «Реконструкция генных сетей, ассоциированных с апоптозом в сетчатке крыс OXYS на разных стадиях ретинопатии» заслуживают внимания и дальнейших исследований, возможно, таким образом будет найден путь создания методов ранней диагностики ВМД.

В главе «Результаты» представлены также разделы «Кластерный анализ графов ассоциативных генных сетей» и «Сравнение изменений с возрастом процессов клеточной гибели в сетчатке крыс OXYS и Вистар». Использованный автором функциональный анализ на основе базы данных KEGG и Rat genome database (RGD) показал, что уровень мРНК генов, включенных в регуляцию апоптоза, некроза и аутофагии у крыс Вистар и OXYS изменяется только в период 20 дней - 3 месяца, были установлены конкретные гены, влияющие на развитие апоптоза у крыс обеих линий.

Теоретический блок «Результатов» диссертационной работы Д.В. Телегиной выполнен на современном уровне и, несомненно, будет полезен широкому кругу исследователей генетических механизмов апоптоза.

Интересные данные получены автором при изучении количества клеток в состоянии апоптоза в сетчатке крыс Вистар и OXYS методом TUNEL. И у тех, и у других животных наблюдалось большое количество TUNEL-позитивных клеток, однако, у крыс OXYS оно достоверно превышало показатели у крыс Вистар.

Интересно, что в дальнейшем число TUNEL-позитивных клеток значительно снизилось у крыс обеих линий, что указывает на завершение активных процессов апоптоза до завершения созревания сетчатки.

К сожалению, исследование роли аутофагии в развитии ВМД ограничено анализом транскриптома, выявление маркеров аутофагии на срезах сетчатки не проводилось. Изучение маркеров некроптоза выявило различия локализации белков RIPK1 и RIPK3 в сетчатке крыс OXYS и Вистар.

Раздел «Морфофункциональные изменения клеток РПЭ с возрастом и при развитии ретинопатии» написан на основе исследования морфологии клеток РПЭ с помощью сканирующей конфокальной микроскопии у крыс Вистар и OXYS в возрасте 20 дней (период окончания созревания сетчатки) и 3 мес. (период выраженных клинических проявлений ретинопатии у крыс OXYS). К содержанию данного раздела, который, несомненно важен для понимания природы деструктивных изменений сетчатки, есть замечания. В частности, визуализация клеток с помощью FITC-Phalloidine выявляет лишь актин, что сильно ограничивает возможность анализа структуры клеток. Действительно, можно определить количество клеток на единицу площади, и автором обнаружено отчетливое снижение количества клеток в центральной зоне сетчатки у крыс OXYS в возрасте 3 мес. Далее автор сообщает о развитии атрофических изменений и обнаружении гипертрофии и гиперплазм клеток ретинального пигментного эпителия, не приводя конкретных структурных параметров, на основании которых были идентифицированы данные изменения. Развитие атрофических процессов, равно как и гиперплазии и гипертрофии, сопровождается определенными морфологическими изменениями, для выявления которых недостаточно определить контуры клеток.

Автором проанализированы изменения соотношения одноядерных, двуядерных и полиплоидных клеток в сетчатке крыс Вистар и OXYS в возрасте 20 дней, 3 и 18 месяцев и установлены изменения этих параметров у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар. Детальное исследование локализации и количества глиальных клеток и макрофагов у крыс Вистар и OXYS в разные периоды жизни, проведенное Д.В. Телегиной, наглядно продемонстрировало важную роль клеток иммунной системы в развитии ретинопатии.

В главе «Обсуждение результатов» Дарья Викторовна анализирует полученные результаты с использованием материала опубликованных исследований. В главе «Заключение» суммируются основные результаты диссертационного исследования.

Выводы диссертации сформулированы чётко и соответствуют цели и задачам, а также основным положениям, выносимым на защиту.

Материалы диссертационного исследования Телегиной Д.В. опубликованы в 4-х статьях в журналах из перечня ВАК, а также были представлены на 4-х научных конференциях.

Вместе с тем, по прочтении диссертации у меня возникли некоторые вопросы и замечания:

1. В тексте диссертации автор широко использует термин «фоторецептор», не объясняя, идет ли речь о целой клетке, или об её определенном участке. В гистологической литературе и учебниках говорится о светочувствительных (фоторецепторных) нейронах, термин «фоторецептор» не используется, однако, в некоторых работах он встречается в как эквивалент фоторецепторного нейрона. Прошу Дарью Викторовну уточнить, о какой структуре идет речь в диссертации и дать её морфологическую характеристику.

2. Я не могу согласиться с определением аутофагии, приводимым автором на с.24: «Аутофагия - это внутриклеточный процесс деградации цитоплазматических компонентов в лизосомах, поддерживающий клеточный гомеостаз и производство энергии». Данное определение не отражает принципиально важный этап аутофагии – секвестрацию участков цитоплазмы, в результате которой образуются аутофагосомы, которые не содержат гидролитических ферментов. Гидролазы вовлекаются в процесс на более поздних стадиях, после слияния аутофагосомы с лизосомами и формирования аутолизосомы. Эти детали важны, поскольку развитие аутофагоцитоза может нарушаться на ранних стадиях, процесс не будет завершен, при том, что его молекулярные маркеры будут регистрироваться. Аналогичная неточность повторяется и в определении **микроаутофагии (с. 25)**: «При микроаутофагии цитозольный материал захватывается непосредственно инвагинациями мембраны лизосомы». Хотелось бы услышать комментарии Дарьи Викторовны по этому поводу.

3. Прошу Дарью Викторовну привести морфологические признаки, на основании которых сделаны заключения о развитии атрофии, гипертрофии и гипоплазии клеток при флуоресцентном исследовании клеток, в которых были визуализированы лишь актиновые филаменты. Прошу также привести научные определения этих процессов и сопоставить их с результатами исследования.

4. Из текста диссертации непонятно, каким методом определялась ploидность клеток, которая прямо не связана с количеством ядер. Прошу автора дать соответствующие комментарии.

Диссертационная работа Дарьи Викторовны изложена четким языком, встречаются отдельные опечатки. Текст автореферата соответствует тексту диссертации и полностью отражает её содержание.

Приведенные вопросы и замечания носят в основном дискуссионный характер и не снижают моей высокой оценки диссертационного исследования Телегиной Д.В.

**Заключение:** диссертационная работа Телегиной Д.В. на тему «Молекулярные механизмы гибели клеток в сетчатке крыс при старении и развитии ретинопатии» является завершённой научно-исследовательской работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная задача изучения механизмов клеточной гибели в сетчатке при старении и при развитии аналогичной ВМД ретинопатии у крыс OXYS. Диссертационная работа соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., а её автор, Телегина Дарья Викторовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Рябчикова Елена Ивановна,

профессор, доктор биологических наук, специальности:

**03.00.11** - гистология, эмбриология и цитология (по действующему перечню специальностей - **03.03.04** - клеточная биология, цитология, гистология);

03.00.06 – вирусология (по действующему перечню специальностей - 03.02.02 вирусология;

заведующая группой микроскопических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Для телеграмм: Новосибирск 90, ИХБФМ

Телефон: (383) 363-51-50

Факс: (383) 363-51-53

E-mail: [lenryab@niboch.nsc.ru](mailto:lenryab@niboch.nsc.ru)

Сайт группы: <http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/structure/labs/microscop>

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



Подпись Рябчиковой Е.И. заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН

К.х.н.



П.Е. Пестряков