

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт систематики и экологии животных
Сибирского отделения Российской академии
наук (ИСиЭЖ СО РАН), член-корреспондент
РАН, профессор



Виктор Вячеславович Глугов

« 30 » сентября 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Чадаевой Ирины Витальевны
«ПРОФИЛИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ОТДЕЛАХ МОЗГА
РУЧНЫХ И АГРЕССИВНЫХ СЕРЫХ КРЫС»,
представленную на соискание учёной степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика

Актуальность исследования. Одомашнивание растений и животных, длящееся более десяти тысячелетий, является одним из самых значительных культурных достижений, повлиявших на эволюционную историю человека. Наибольшее влияние на процесс одомашнивания оказывает отбор. На первых этапах исторической domestikации бессознательный и ненаправленный он с течением времени переходил в систематический, сознательно направленный на те или иные свойства организма. При domestikации первых видов диких животных имело большое значение преобразование настороженного и враждебного, а зачастую и агрессивного, по отношению к человеку, поведения в дружелюбное. При этом главной генетической мишенью отбора, в какой бы форме он ни осуществлялся, выступают гены, контролирующие поведение, в связи с чем особое значение при исследовании механизмов domestikации приобретает экспериментальный подход.

Широко известно, что в Институте цитологии и генетики в первые же годы его научной деятельности (1959–1960) по инициативе директора академика Д.К. Беляева была организована работа по экспериментальному воспроизведению процесса одомашнивания животных на пушном объекте

клеточного разведения – лисице (*Vulpes vulpes*), другим объектом экспериментальной domestikации являлись серые крысы. На основе полученных в ходе этого эксперимента фактов Д.К. Беляев разработал концепцию о наличии в природе дестабилизирующего отбора как специфической формы движущего отбора. Результатом действия такого отбора является дестабилизация регуляторных систем онтогенеза, затрагивающая регуляцию экспрессии генов и влияющую на системы нейроэндокринного контроля онтогенеза при стрессовом воздействии окружающей среды.

Несмотря на длительный и успешный опыт по одомашниванию многих видов животных, в исследовании этого сложного, многофакторного процесса до сих пор имеется множество белых пятен, включающих, в том числе, молекулярно-генетические механизмы domestikации. В связи с этим, диссертационное исследование И.В. Чадаевой, направленное на выявление молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе агрессивного или ручного поведения селекционированных по реакции на человека, двух линий серых крыс (*Rattus norvegicus*) представляется весьма актуальным.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. В ходе исследования были получены новые данные о генетических механизмах domestikации, связанных с преобразованием в результате отбора агрессивного («дикого») по отношению к человеку поведения в спокойное («ручное»): установлены дифференциально экспрессирующиеся гены в отделах головного мозга серых крыс с контрастными типами поведения по отношению к человеку. Проверена гипотеза формирования генетической базы domestikационного синдрома, общего для разных видов одомашненных животных. Проведён функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся в отделах мозга генов в связи с их возможной ролью в регуляции агрессивного и ручного поведения. Результаты данной работы предоставляют фактические данные о генах, изменяющих экспрессию в ответ на искусственный отбор по поведению, что может быть использовано при селекции животных в сельском хозяйстве и в ветеринарии.

Достоверность полученных результатов, выводов и заключений. Исследование И.В. Чадаевой является частью долгосрочной научно-исследовательской программы, включающей комплекс задач по выявлению механизмов domestikации, проводимой в институте Цитологии и генетики

СО РАН. Результаты, полученные на ручных и агрессивных серых крысах как лабораторной модели доместикиации, представляют пример искусственного отбора по поведению как частного случая дестабилизирующего отбора, который действует при вовлечении в селекцию нейроэндокринных систем адаптации в процессе доместикиации (Беляев, 1979).

Достоверность полученных результатов определяется тщательным планированием эксперимента, использованием современных методов молекулярно-генетического анализа и последующим биоинформатическим анализом полученных данных.

По теме диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых научных изданиях, что заметно превышает количество публикаций, рекомендованных ВАК (не менее 2), все 7 в журналах, индексируемых и в Web of Science, и в Scopus (5 Q1 и 2 Q2). Результаты исследований неоднократно докладывались автором на научных конференциях Всероссийского и Международного уровней и известны научному сообществу.

Оценка содержания диссертации, её завершенность в целом, замечания по оформлению. Рукопись состоит из следующих разделов: Введение, 4 главы, Заключение, Выводы, Список литературы и Приложение. Работа изложена на 181 страницах, содержит 11 таблиц и 17 рисунков. Список литературы содержит 236 источников (из них 197 на иностранных языках). Диссертация написана хорошим русским языком, обладает внутренним единством, легко читается. Рисунки и таблицы хорошего качества, в цветном исполнении, что облегчает восприятие материала. Оформление диссертации соответствует принятым на сегодняшний день правилам (ГОСТ Р 7.0.11–2011). Текст очень хорошо выверен и лишь изредка встречаются мелкие погрешности редактирования (на стр. 66 оставлено большое белое поле; Benjamini транскрибировано как Бенжамини, хотя принято писать Бенджамини).

Глава 1 представляет собой полноценный литературный обзор, который включает краткую историю доместикиации разных видов растений и животных, описание наблюдений за фенотипическими изменениями животных в ответ на одомашнивание, так называемый, «синдром доместикиации», обсуждение различных подходов к исследованию генетической основы доместикиации животных и их ручного/агрессивного

поведения. В главе приводятся результаты полногеномных исследований domesticated животных в сравнении с их дикими конспецификами. Далее автор подробно останавливается на описании модельных объектов доместикации, уделяя особое внимание серой крысе, а также роли разных отделов мозга в контроле агрессивного поведения. Обзор хорошо структурирован, включает несколько подразделов, демонстрирует высокую эрудицию автора в выбранной проблематике и опирается как на первоисточники, отражающие исторические аспекты возникновения затронутых проблем, так и охватывает самые современные публикации, включая обсуждение дискуссионных моментов.

В Главе 2. Материал и методы приводится описание экспериментальных животных – двух аутбредных линий серых крыс, ручной и агрессивной, даются краткие характеристики использованных выборок, количество исследованных биологических образцов из разных отделов головного мозга, использованных для РНК-секвенирования и для проведения полуколичественной ПЦР в реальном времени. Отдельные разделы главы посвящены методикам выделения РНК из тканей головного мозга серых крыс и последующему биоинформатическому анализу транскриптома. Глава также содержит информацию о используемом в работе методе полуколичественной ПЦР в реальном времени и функциональном анализе дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ). Статистический анализ результатов экспериментов выполнен с использованием t-теста (критерий Стьюдента) и методом главных компонент. В целом, приведённые в главе сведения свидетельствуют о том, что дизайн эксперимента позволяет решить все поставленные автором задачи на высоком научном уровне.

В Главе 3 изложены результаты проведённых исследований. Глава разделена на несколько подразделов.

3.1. Анализ секвенирования транскриптомов в структурах головного мозга ручных и агрессивных крыс. В результате обработки данных полногеномного секвенирования мРНК (RNA-Seq) была получена информация об уровне транскрипции всех генов в исследуемых образцах 4 отделов мозга ручных и агрессивных крыс. По транскриптомным профилям выявлены достоверные различия между агрессивной и ручной линиями крыс для 44 генов в гипоталамусе, 42 генов в гиппокампе, 39 генов в сером веществе периакведуктума и 32 генов в покрышке среднего мозга.

Полученные данные по дифференциальной экспрессии генов у ручных и агрессивных крыс были проанализированы методом главных компонент. В работе обсуждаются PC1 и PC2, как компоненты с наибольшей дисперсией (29% и 17% изменчивости соответственно). По PC1 выявлено разделение ручных и агрессивных крыс на две группы по 26 генам, из них 16 генов имели повышенную экспрессию у ручных крыс, а 10 других – повышенную экспрессию у агрессивных. Компонента интерпретирована как «генетическая детерминация поведения». Компонента PC2 коррелирует с величинами экспрессии 5 генов в гиппокампе: *Lypd1*, *Htr5b*, *Myom2*, *Nr4a3* и *Emx2*, причём 4 гена из 5 имеют значимое увеличение экспрессии в гиппокампе по сравнению с другими структурами, как у ручных, так и у агрессивных крыс. Тогда как у гена *Lypd1* экспрессия в гиппокампе серых крыс обеих линий снижена. В связи с этим, PC2 интерпретирована как «структура мозга». Таким образом, компонентный анализ выявил группы ДЭГ в четырёх структурах головного мозга (гипоталамус, гиппокамп, серое вещество периакведуктума и покрышка среднего мозга) позволяющие разделить ручных и агрессивных крыс по генетическим детерминантам их поведения.

Из 112 ДЭГ уровни экспрессии семи значимо различаются между двумя группами животных во всех четырёх исследованных структурах мозга. Этот результат получен на домашних и диких кроликах, где было обнаружено 27 из 612 ДЭГ, изменения экспрессии которых оказались общими для выбранных отделов мозга (височно-теменная область, миндалевидное тело, гипоталамус и гиппокамп (Sato *et al.*, 2020).

3.2. Верификация дифференциальной экспрессии генов в образцах головного мозга ручных и агрессивных крыс методом полуколичественной ПЦР в реальном времени. В разделе проведено экспериментальное подтверждение данных РНК-секвенирования в образцах головного мозга ручных и агрессивных крыс методом полуколичественной ПЦР в реальном времени для трёх дифференциально экспрессирующихся генов (*Apobec1*, *Ascl3* и *Defb17*), при нормировании на 4 гена сравнения (*B2m*, *Hprt1*, *Ppia* и *Rpl30*). Дополнительно также исследовано 10 генов, которые по литературным данным связаны с агрессивным поведением (*Cacna1b*, *Cacna2d3*, *Drd2*, *Egr1*, *Gad2*, *Gria2*, *Mapk1*, *Nos1*, *Pomc* и *Syn*)1. В разделе детально обсуждаются значения мРНК генов в разных отделах мозга ручных и агрессивных крыс, результаты сравнения, в целом, подтверждают данные по дифференциальной экспрессии генов, полученные при секвенировании РНК.

3.3. Функциональная аннотация ДЭГ в структурах головного мозга ручных и агрессивных крыс. Объединённый по четырём отделам мозга список ДЭГ (112 генов) проанализирован в базе данных DAVID Bioinformatics Resources (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), проведена их функциональная аннотация, включающая анализ биологических процессов и метаболических путей. При расчётах обогащения ДЭГов в категориях KEGG PATHWAY и Gene Ontology относительно всех генов, экспрессирующихся в исследованных отделах мозга, по результатам настоящего исследования, ручных и агрессивных крыс, и относительно генома серых крыс, установленного в DAVID по умолчанию, получены идентичные результаты. Проведённый анализ позволил определить, какие из биологических процессов могли привести к изменениям поведенческой реакции по отношению к человеку у крыс двух линий, ручной и агрессивной. С помощью общедоступного веб-сервиса STRING была построена ассоциативная сеть на основе взаимодействий между заданными дифференциально экспрессирующимися генами. Анализ полученных генных сетей свидетельствует о наличии разветвлённой системы генетической регуляции функций мозга, сформированной в результате селекции серых крыс по поведению. Различная экспрессия генов данной сети у ручных и агрессивных крыс подтверждает важность этой сетевой генной структуры как комплексного генетического регулятора в детерминации сложных форм контрастного поведения у сравниваемых линий крыс. Причём, некоторые гены, отличающиеся большим числом взаимодействий (такие как *Alb*, *Pdyn*, *Eif2b3*, *Nr4a3*, *Pygl* и другие), могут служить в качестве узловых регуляторов работы данной генной сети. Особенно хочется выделить, что среди генов, которые показали наличие достоверных корреляций с PC1, обозначенной автором как «Генетическая детерминация поведения» присутствуют гены транскрипционного фактора (*Fosb*) и ингибитора серинпептидазы (*Spint1*), гены, ответственные за стресс-ответ (*Bdkrb2*, *Fosb*, *Hspala*, *Hspalb*, *Pcdhb9*), непосредственные регуляторы нейрохимических процессов (*P2rx4*, *Rbm3*, *Slfn13*, *Sh3bgr*), гены-регуляторы иммунных процессов (*Defb17*, *Fcgr2b*, *Mpeg1*, *Cd22*) и липидного метаболизма (*Aox1*, *Liph*, *Pla2g2d*, *Retsat*), репарации (*Mrell1a*) и репликации (*Mcm10*) ДНК. При этом можно отметить, что при функциональном аннотировании коррелирующих с PC1 26 ДЭГ не все из них попали в категории GO.

3.4. Сравнение ДЭГ в образцах гипоталамуса ручных и агрессивных крыс с ДЭГ других домашних и диких животных. Такой

анализ был проведён впервые. Составлен список из 44 ДЭГ гипоталамуса ручных и агрессивных крыс и гомологов этих генов, взятых из 14 опубликованных наборов данных RNA-Seq по домашним и диким животным. При совмещении списков генов были получены 54 пары гомологичных генов, где один ген определён в настоящей работе как дифференциально экспрессирующийся, а пару ему составляет один или несколько дифференциально экспрессирующихся генов-гомологов (гены-ортологи и гены-паралоги) из работ других авторов, выполненных на других видах животных. Для анализа полученных таким образом данных, использовали метод главных компонент. В работе рассматриваются две первые главные компоненты. В результате дальнейшего статистического анализа было установлено, что dwPC1 можно условно обозначить как «Доместикация», поскольку она объединяет гены с однонаправленным изменением экспрессии, из чего можно заключить, что эта компонента отражает общий для разных видов ответ на искусственный отбор при одомашнивании. Компонента dwPC2 отражает видовые особенности эффектов доместикации и её можно обозначить как «Видоспецифичные изменения». Таким образом, впервые идентифицированы общие гены-ортологи, уровни экспрессии которых изменяются однонаправленно под давлением искусственного отбора у различных домашних животных по сравнению с их дикими конспецификами. Такие гены независимо от вида животного и тканеспецифичности статистически значимо сохраняют направление изменений между группами. В то же время уровни экспрессии у ДЭГов ручных/агрессивных крыс и их одиночных ортологов у других видов могут изменяться разнонаправленно, в зависимости от вида животного и ткани/органа, отражая видоспецифическую изменчивость. Полученные результаты несомненно имеют фундаментальное значение для биологии.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ разбита на несколько подразделов в которых автор проводит сравнительный анализ полученных результатов с результатами других авторов, используя самые последние публикации по теме исследования.

В работе также имеются раздел **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**, в котором автор подводит краткий итог проведённому исследованию.

ВЫВОДЫ, (их 6) сформулированы чётко и полностью обоснованы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ оформлен согласно существующим на сегодняшний день требованиям.

ПРИЛОЖЕНИЕ содержит одну таблицу.

Содержание автореферата полностью соответствует содержанию рукописи диссертации. Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 1.5.7. – генетика.

Замечания и вопросы, возникшие при ознакомлении с диссертацией. Рецензируемая диссертация, как любое большое исследование, не лишена некоторых мелких недостатков и спорных моментов. В частности, стр. 64, раздел **2.6 Статистический анализ:**

«Статистический анализ результатов экспериментов выполнен с использованием t-теста (критерий Стьюдента) и методом главных компонент ... Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.»

Но и вычисление статистических параметров выборок и стандартизация выборок, если необходимо, выполняются до использования t-теста или РСА.

Стр. 72. Рисунок 4. Что означают вертикальные черные отрезки?

Стр. 77–78. Рисунки 8, 9. Почему ограничились первым уровнем? Судя по графикам, достоверность результатов намного выше.

В целом, отмеченные недостатки не влияют на высокую оценку представленной диссертантом работы.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения учёных степеней. Диссертация Чадаевой Ирины Витальевны «Профили экспрессии генов в отделах мозга ручных и агрессивных серых крыс», представленная к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика, является законченной научно-квалификационной работой, направленной на решение актуальной научной задачи, имеющей существенное значение для генетики. По своей актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований, теоретическому уровню и практической значимости результатов, а также числу и значимости публикаций, представленная работа полностью соответствует квалификационным критериям пп. 9-14 Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 25.01.2024), «О порядке присуждения учёных степеней», а её автор – Чадаева Ирина

Витальевна, заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика.

Отзыв на диссертацию подготовлен ведущим научным сотрудником лаборатории экологии сообществ позвоночных животных ИСиЭЖ СО РАН д.б.н. В.Ю. Ковалевой. Отзыв заслушан, обсуждён и одобрен на расширенном семинаре лаборатории экологии сообществ позвоночных животных с приглашением специалистов из других лабораторий ФГБУН ИСиЭЖ СО РАН.

На семинаре присутствовало 10 человек. Поддержано: за – 10, против – 0, воздержавшихся – 0.

Протокол заседания № ~~157~~ от 30 сентября 2024 г. Адрес ФГБУН ИСиЭЖ СО РАН: 630091, Новосибирск, Россия, ул. Фрунзе, д. 11.

Тел./Факс: +7(383) 217-09-73

E-mail: office@eco.nsc.ru.

Председатель семинара

Заведующий лабораторией экологии сообществ позвоночных животных ИСиЭЖ СО РАН,

кандидат биологических наук

630091, Новосибирск, Россия, ул. Фрунзе, д. 11

Тел. (383) 2170-408

E-mail: igmor@list.ru



И.В. Моролдоев

Ведущий научный сотрудник лаборатории экологии сообществ позвоночных животных ИСиЭЖ СО РАН, доктор биологических наук

630091, Новосибирск, Россия, ул. Фрунзе, д. 11

Тел. (383) 2170-408

E-mail: v_kov_65@mail.ru



В.Ю. Ковалева

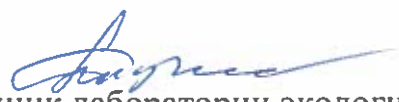
Секретарь семинара

Старший научный сотрудник лаборатории экологии сообществ позвоночных животных ИСиЭЖ СО РАН, кандидат биологических наук

630091, Новосибирск, Россия, ул. Фрунзе, д. 11

Тел. (383) 2170-408

E-mail: dupalgf54@gmail.com



Т.А. Дупал



Подписи Моролдоева И.В.,
Ковалевой В.Ю., Дупал Т.А.
и др.