

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Л.Ф. Гуляевой на диссертационную работу Юдкина Дмитрия Владимировича «Молекулярно-биологические основы синдрома ломкой X-хромосомы», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология

Актуальность диссертационной работы

Диссертационная работа Юдкина Д.В. посвящена комплексному исследованию синдрома ломкой X-хромосомы и ассоциированных с ним заболеваний, разработке подходов для диагностики и лечения этих заболеваний. Данные патологии обусловлены экспансией повтора CGG в промоторной области гена *FMRI* (Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1). Различают два патологических аллеля, которые отличаются количеством повторенных единиц триплета CGG: премутацию и полную мутацию. Они встречаются в человеческой популяции с частотой 1/200-300 и 1/4000-6000 соответственно. Полная мутация приводит к развитию умственной отсталости и является второй по распространённости формой такой патологии после синдрома Дауна. Высокая частота встречаемости заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, отсутствие подходов для их терапии делает представленное диссертационное исследование крайне актуальным.

Научная значимость и новизна работы, на мой взгляд не вызывает сомнений. В диссертации подробно представлено исследование соматической нестабильности повтора CGG как у лабораторных животных, так и у пациентов с фраксопатиями. Впервые показано, что в различных органах разный уровень соматической нестабильности. Автором внесён значительный вклад в исследование соматической нестабильности повтора CGG у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и установлению ее связи со степенью изменений в головном мозге. Для этого использован специально разработанный критерий – индекс соматической нестабильности,

который не зависит от эффективности амплификации повтора. Впервые проведено исследование репликации в районе ломких сайтов FRAXA и предложена модель их образования, основанная на недорепликации участка повтора CGG. Таким образом, необходимо подчеркнуть важное фундаментальное значение результатов, полученных в диссертационной работе.

Несомненна и **практическая значимость** работы. В диссертации приведен молекулярно-цитогенетический подход для выявления ломких сайтов FRAXA у пациентов. Для этого предлагается использовать флуоресцентную гибридизацию *in situ*. Показана статистическая достоверность предложенного метода. Он использован для исследования большой выборки пациентов с подозрением на синдром ломкой X-хромосомы из ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница №1». В рамках поиска терапии синдрома ломкой X-хромосомы впервые исследовано влияние одобренных для клинического применения ингибиторов гистоновых деацетилаз на активность экспрессии гена *FMR1*.

Достоверность представленных в работе результатов не вызывает сомнений и обеспечивается: 1. Адекватным выбором модельных объектов; 2. Использованием современного оборудования и широкого спектра взаимодополняющих методов, адекватных целям и задачам работы; 3. Обширным объемом полученных экспериментальных данных и их детальным анализом. Все проведенные эксперименты имеют адекватные контроли и статистическую обработку.

Выводы и положения, выносимые на защиту, корректны и в полной мере отражают полученные результаты.

Достоверность результатов также подтверждена апробацией работы на многих российских и международных конференциях. По теме исследования опубликовано 20 работ в журналах из перечня ВАК.

Характеристика диссертации

Диссертация работа Д.В. Юдкина оформлена на 249 страницах машинописного текста и состоит из введения, 6-ти глав, содержащих обзор литературы, материалы и методы, результаты, а также заключения, выводов, списка литературы и приложений. В диссертации представлено 38 рисунков и 8 таблиц. В списке литературы указаны 466 источников.

Введение написано в соответствии с требованиями ВАК. В нем приводится обоснование актуальности проводимого исследования, из которой логично следуют цели и задачи. Также во введении описывается научная новизна работы и теоретическая и практическая значимость с указанием того, как разработанные подходы были использованы в диагностике пациентов. Во введении представлены положения, выносимые на защиту, список конференций, на которых были представлены результаты работы и информация о личном вкладе автора.

Глава 1 представляет собой обзор литературы, состоящий из нескольких разделов, посвященных описанию заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой на молекулярном и клиническом уровнях, эпигенетическим особенностям локуса *FMRI* при экспансии повтора, описанию участия микроРНК в развитии фраксопатий, детальному описанию соматической нестабильности, методов ее оценки и вероятных причин, участию AUG-независимой трансляции в патогенезе этих заболеваний, анализу ломкости хромосом и существующим методам диагностики и лечения.

В главе «Материалы и методы» автор очень подробно описывает все используемые модели, приводится информация о допусках этических и биоэтических комитетов и информированных добровольных согласиях, что подтверждает, что вовлечение пациентов в работу проведено с учетом всех необходимых процедур в соответствии с законодательством. Использован

большо спектр молекулярно-биологических методов. Описание всех методик сделано в соответствии с общепринятыми нормами.

Глава 3 посвящена исследованию соматической нестабильности, как на модельных объектах, так и у пациентов с фраксопатиями. В этой главе приведены данные о различиях степени экспансии в разных тканях. Также здесь вводится и обосновывается критерий оценки степени экспансии – индекс соматической нестабильности. Приводятся данные по анализу изменений функциональной коннективности между отделами головного мозга пациентов с фраксопатиями и их взаимосвязь с индексом соматической нестабильности.

В главе 4 описан метод молекулярно-цитогенетической визуализации ломкого сайта FRAXA. Описаны типы сигналов, характерные для нормальных X-хромосом и X-хромосом с ломким сайтом. Приводится пример использования разработанного подхода для анализа клинического случая.

Глава 5 посвящена исследованию ориджинов репликации, а именно их активации в районе промотора гена *FMRI*. В этой главе показано, что при экспансии повторов происходит снижение активации репликации в этом локусе, а индукторы ломких сайтов снижают репликацию в клетке в целом, что приводит к недорепликации в районе экспансии. Предложена модель, описывающая образование ломких сайтов FRAXA.

В главе 6 приведено исследование влияния ингибиторов гистоновых деацетилаз, ромидепсина и вориностата, на экспрессию гена *FMRI*. Именно восстановление экспрессии этого гена путем подавления гетерохроматинизации рассматривалось как один из подходов для терапии синдрома ломкой X-хромосомы. Автором показано, что уровень экспрессии после обработки незначительный при высокой цитотоксичности препаратов.

Раздел заключение посвящен комплексному анализу всех полученных результатов и обсуждению их значения для развития методов диагностики и терапии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой.

Представленная диссертация написана логично. Рисунки полностью отражают полученные данные и позволяют не сомневаться в их достоверности. Выводы из проведенного исследования логичны и полностью соответствуют результатам.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе у меня нет. При прочтении работы у меня появились вопросы дискуссионного характера:

1. Может ли иммортализация клеток вирусом Эпштейна-Барр повлиять на исследование экспансии триплетов CGG?
2. В «Материалах и методах» автор описывает определение уровня экспрессии гена как количественный анализ мРНК. Насколько это количественный метод, когда рассматривается соотношение значений Ct в органах к значению Ct в сердце?
3. Как можно объяснить различающийся индекс соматической нестабильности в различных органах мышей с премутацией по гену *fmr1*?, а также высокий уровень его экспрессии в головном мозге и почках?
4. Результаты показали, что активация гена *FMR1* с помощью ингибиторов ДНК-метилтрансфераз значительно выше, чем с помощью ингибиторов деацетилаз гистонов. Что можно сказать о перспективности использования первых для лечения пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы?

Заключение.


Диссертационная работа Юдкина Дмитрия Владимировича «Молекулярно-биологические основы синдрома ломкой X-хромосомы», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология, является законченной

научной работой, в которой проведено обширное исследование молекулярных основ патогенеза, методов диагностики и терапии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой.

По актуальности, новизне, научной и практической значимости, а также методологическому и методическому уровню полученных результатов рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует критериям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук согласно п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»



Гуляева Людмила Федоровна

Дата: «17» октября 2023г.

Подпись д.б.н., профессора Гуляевой Людмилы Федоровны

Заверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ ФИЦ ФТМ

д.б.н.



Пальчикова Наталья Александровна

Дата: «17» октября 2023г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» 630117, Россия, Новосибирская область, г. Новосибирск, улица Тимакова, 2. Телефон: +7 (383) 274-95-80. E-mail: director@frcftm.ru. Сайт: www.frcftm.ru.

Личную подпись Гуляевой Л.Ф. заверяю
Пальчиковой Н.А.
вед. специалист отдела кадров ФИЦ ФТМ
"18" октября 2023 г. подпись Л.О.В.

