

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Салиной Елены Артемовны на диссертацию 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 темы**

Умственная отсталость является патологией, которая имеет очень важное социальное значение. Среди целого ряда причин развития умственной отсталости необходимо выделить генетическую. Синдром ломкой X-хромосомы (синдром Мартина-Белл), исследованию которого посвящена работа, является второй по распространенности причиной наследственной умственной отсталости и встречается с частотой 1/4000-1/6000. Развитие синдрома происходит из-за экспансии тринуклеотидного повтора CGG в промоторной области гена *FMRI* (familial mental retardation). Эта мутация приводит к гетерохроматинизации участка и прекращению экспрессии гена в результате чего перестает синтезироваться белок FMRP. Этот РНК-связывающий белок крайне важен для развития нейронов в эмбриональном периоде и поэтому его отсутствие приводит к нейродегенерации и умственной отсталости. Развитие синдрома Мартина-Белл происходит если длина повторенного тракта CGG превышает 200 триплетов. Такой аллель называется полная мутация. Однако для синдрома ломкой X-хромосомы, как и для других экспансионных заболеваний, существуют премутантные аллели, длина повторенного тракта в которых больше 50, но меньше 200 триплетов. Премутантные состояния встречаются с частотой 1/200-1/400 и у ряда носителей вызывают синдромы атаксии/тремора и первичной овариальной недостаточности, ассоциированные с ломкой X-хромосомой. В развитии патологии премутантных состояний принимают участие многие молекулярно-биологические процессы. Сама экспансия в этом случае не блокирует работу гена *FMRI*, но нарушает баланс мРНК и белка FMRP.

Все заболевания, ассоциированные с ломкой X-хромосомой, на сегодня не излечимы. Существуют лишь симптоматические подходы, которые позволяют временно снизить некоторые нейропатологические проявления. Что касается диагностики, то она затруднена на молекулярном уровне из-за трудности амплификации крайне GC-богатого участка.

Диссертационная работа Юдкина Д.В. посвящена комплексному анализу молекулярных патологий, возникающих при заболеваниях, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, а также оптимизации методов диагностики и поиску путей лечения. Таким образом, с учетом вышесказанного, ее актуальность не вызывает сомнений.

**Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций** обеспечена анализом имеющейся по теме диссертации литературы, адекватным выбором объектов и методов исследования и статистической обработки результатов, научными публикациями по теме диссертации и представлением результатов на научных мероприятиях.

Все изложенное позволяет считать результаты диссертационного исследования достоверными, а выводы обоснованными, соответствующими поставленным задачам.

**Научная новизна** представленного исследования несомненна. Так впервые представлены результаты исследования соматической нестабильности повтора CGG у лабораторных животных и в различных тканях человека с премутацией по гену *FMRI*. Предложен новый подход для расчета индекса соматической нестабильности именно для CGG-повтора.

Впервые в качестве подхода для диагностики синдрома ломкой X-хромосомы предложен метод визуализации ломкого сайта FRAXA. Автором выявлено несколько паттернов локализации зондов при флуоресцентной *in situ* гибридизации, частота встречаемости которых достоверно изменяется в ответ на добавление фтордезоксисуридина.

В представленной диссертации впервые предложена модель образования ломкого сайта на X-хромосоме у пациентов с синдромом Мартина-Белл. Модель основана на результатах исследования уровня репликации в локусе *FMRI* при экспансии повторов, в присутствии и отсутствии фтордезоксисуридина.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Диссертация Д.В. Юдкина имеет как теоретическую, так и практическую значимость. Результаты исследования соматической нестабильности, ее влияния на остроту симптомов пациентов с заболеваниями, ассоциированными с ломкой X-хромосомой, анализ природы ломкого сайта FRAXA и влияния ацетилирования гистонов на активность гена *FMRI* вносят значительный вклад в понимание механизмов развития фраксопатий.

Установление влияния индекса соматической нестабильности на остроту симптомов фраксопатий имеет важное значение для прогноза в медико-генетических консультациях. Разработанный подход для определения ломкого сайта FRAXA уже показал свое важное

практическое значение при использовании для анализа образцов периферической венозной крови пациентов с подозрением на синдром ломкой X-хромосомы в ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница №1».

### **Оценка содержания диссертации, ее завершенности, подтверждение публикаций автора**

Представленная диссертация изложена на 249 страницах и состоит из введения, шести глав, включающих в себя обзор литературы, материалы и методы, результаты, а также заключения с выводами, список литературы, приложения. Работа иллюстрирована 8 таблицами, 21 рисунком. Список литературы включает 466 источников, в том числе 5 на русском языке.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, определены цель и задачи диссертационной работы, методология проведенного исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость работы, описана апробация результатов исследования.

В обзоре литературы представлен анализ современной научной литературы, описывающей природу заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, участие гетерохроматинизации и микроРНК в развитии этих патологий. Автором проведен подробный анализ имеющейся информации о нестабильности повторов и ее вероятных причинах. Также представлена исчерпывающая информация о современных подходах к диагностике и лечению фраксопатий.

Обзор литературы хорошо и доступно представляет анализ имеющейся научной литературы по теме диссертации, в нем присутствует авторская оценка материалов и их связь с результатами, полученными непосредственно самим автором.

Представленный обзор литературы подтверждает актуальность диссертационной работы.

Раздел «Материалы и методы» написан четко и информативно. В разделе представлена подробная информация об использованных трансгенных мышцах, культурах клеток, тканях пациентов. Также информация об этической стороне вовлечения пациентов работу. В этой части работы подробно описаны молекулярные и молекулярно-цитогенетические подходы, которые были использованы. Таким образом, автором при проведении исследования использован широкий набор методов, позволивший получить достоверные, информативные и интересные результаты.

Собственным результатам автора посвящены четыре главы диссертации. Здесь рассмотрено влияние таких параметров как возраст носителя и тип ткани на степень соматической экспансии. Представлена схема расчета индекса соматической нестабильности, которая не зависит от эффективности амплификации аллелей. Представлены примеры вычисления этого показателя для индивидуумов с разным числом аллелей и разной длиной повтора CGG. Кроме того, представлены интересные результаты исследований корреляций индексов соматической нестабильности и остроты симптомов фраксопатий. Показано прогностическое значение этих данных.

Представлены прекрасно иллюстрированные данные по разработке подхода для выявления ломких сайтов хромосом с помощью FISH с использованием двух зондов, маркирующих ломкий сайт и теломерный фрагмент, который теряется при разрыве в локусе FRAXA. Приведен пример использования этого подхода при анализе причин умственной отсталости в семье, в которой несколько человек несут данную патологию.

Автором детально исследована активация репликации в локусе FRAXA в культурах клеток пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, носителей премутации и здоровых контролей. Был проведен ряд экспериментов для анализа влияния на ломкость хромосом различных веществ, которые блокируют репликацию, либо вступление клеток в митоз, а также изучено влияние фтордезоксисуридина на активацию репликации. Полученные результаты позволили составить модель образования ломкого сайта в гене *FMR1*, которая основана на проблемах процесса репликации.

Проведено исследование влияния ингибиторов гистоновых деацетилаз на экспрессию гена *FMR1*. Именно ингибирование ферментов, запускающих гетерохроматинизацию, рассматривалось как один из возможных подходов для терапии фраксопатий, и деацетилазы гистонов это пример таких ферментов. Полученные автором результаты свидетельствуют о том, что уровень восстановления экспрессии целевого гена слишком низкий, при этом все исследованные препараты показали высокую цитотоксичность. Таким образом деацетилазы гистонов не могут рассматриваться как перспективные мишени для терапии фраксопатий.

Заключение в диссертационной работе основано на обсуждении результатов изучаемой проблемы в контексте с имеющимися литературными данными. Выводы, сделанные автором, полностью основываются на представленном материале.

**Степень достоверности и апробация результатов** этой комплексной работы не вызывает сомнений. Все полученные в ходе исследования экспериментальные данные

хорошо представлены. По результатам диссертационного исследования опубликовано 20 научных работ, материалы представлены на 9 международных и российских научных конференциях. Автореферат и опубликованные работы в полной мере отражают содержание диссертации, поставленные цели и задачи.

### **Вопросы и замечания**

1) Рис.16 В – Чем можно объяснить высокий уровень фона при проведении фрагментного анализа?

2) Рис.19 и 20 – В подписи не хватает информации о связи между пациентами и их матерями. Если бы при обозначении пациента в скобках указать цифровой номер матери, то это позволило бы сопоставить результаты по линии родства.

3) Таблица 5 в диссертации (или таблица 1 в автореферате) – в подписи не хватает характеристики пациентов. Если в полном тексте диссертации эту информацию можно найти в материалах и методах, то автореферате она отсутствует.

4) Повтор CGG расположен в промоторной области гена FMR1, как указано в литературном обзоре и в тексте диссертации, однако на рисунке 29 его расположение показано в первом экзоне.

5) Возможно ли в качестве диагностических маркеров заболевания использовать ПЦР в реальном времени с праймерами FraX1.5, FraX1c, FraX11, FraX12? По крайней мере результаты, представленные на рис. 33 указывают на возможную перспективу их использования для диагностики.

### **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 завершенной работой, в которой на основе выполненных автором исследований и проведенного анализа систематизированы данные о молекулярных основах развития заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, методах их диагностики и лечения.

По своей актуальности, научной новизне, методическому уровню, объему выполненных исследований и уровню научных публикаций работа 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 сам автор по совокупности представленных им материалов, актуальности темы выполненной диссертации, научно-практической значимости и ценности полученных результатов, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник  
отдела молекулярной генетики растений  
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения  
Российской академии наук»

Салина Елена Артемовна

20.11.2023

Юридический адрес: ИЦиГ СО РАН, пр. Лаврентьева 10, Новосибирск, 630090

Телефон: +7 (383) 363-49-95

Электронная почта: salina@bionet.nsc.ru

