

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук профессора Елены Ивановны Рябчиковой 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

Стремительное развитие биомедицины привело к открытию ранее неизвестных болезней, а изучение и расшифровка генетического кода позволили установить причины многих генных и хромосомных патологий. В настоящее время известно более 3000 заболеваний, связанных с количественными и качественными изменениями генетического материала, одним из которых является синдром ломкой X-хромосомы, наблюдаемый и у женщин, и у мужчин, который относится к группе патологий, сцепленных с полом. Наличие в генотипе мужчин одной X-хромосомы приводит к более частому и выраженному проявлению синдрома. Женщины значительно чаще выступают носителями синдрома, и передают измененную X-хромосому с одинаковой вероятностью как дочерям, так и сыновьям. В научном и медицинском сообществе существует озабоченность нарастанием частоты встречаемости синдрома ломкой X-хромосомы из поколения в поколение, и обсуждается целесообразность широкого охвата населения диагностикой синдрома ломкой X-хромосомы. Психосоматические расстройства при синдроме ломкой X-хромосомы обусловлены патологическим увеличением в гене *FMR1* X-хромосомы числа специфических повторов цитозин-гуанин-гуанин (Ц-Г-Г, CGG) в сотни раз. Экспансия повтора CGG в гене *FMR1* приводит к нарушению синтеза белка FMR1, вовлеченного в развитие и правильное функционирование нервной системы, в частности, синапсов. Синдром ломкой X-хромосомы является одной из самых распространенных причин наследственной умственной отсталости у человека, занимая второе место по частоте встречаемости после синдрома Дауна.

С синдромом ломкой X-хромосомы связан целый набор заболеваний, имеющих сложную молекулярно-генетическую природу, зависящую от размера экспансии повтора CGG, а также от участия разных молекулярно-генетических процессов, например, микроРНК-регуляции или AUG-независимой трансляции. Картину

осложняет существование премутантных состояний, которые встречаются с частотой 1/200-1/400 и приводят к развитию синдрома атаксии/тремора, и синдрома первичной овариальной недостаточности, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Полная мутация встречается с частотой 1/4000-1/6000 и приводит к развитию синдрома Мартина-Белла.

Синдром ломкой X-хромосомы является значимой медико-социальной проблемой, требующей разработки эффективных методов диагностики и лечения, что в полной мере определяет **актуальность темы диссертационного исследования** Юдкина Д.В.

Диссертационное исследование Дмитрия Владимировича направлено на решение комплексной задачи изучения механизмов патогенеза заболеваний, связанных с наличием ломкой X-хромосомы. В работе представлен разработанный автором метод диагностики синдрома ломкой X-хромосомы, который был успешно использован в медико-генетических консультациях, и подходы к поиску терапии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. В связи с вышесказанным диссертационная работа Юдкина Д.В. является актуальной в контексте проводимых в мире исследований и практической значимости.

Научная новизна диссертационной работы Дмитрия Владимировича определяется впервые полученными результатами, а также комплексным описанием патогенеза заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, подходов к их диагностике и лечению. Автором впервые показано, что степень соматической нестабильности отличается в разных органах и зависит от возраста. Предложен подход для определения индекса соматической нестабильности, который не зависит от эффективности амплификации. Ранее этот показатель рассчитывали исходя из высоты пика при фрагментном анализе, определяя основной аллель, однако в случае повторов CGG этот подход не корректен из-за зависимости эффективности амплификации от длины повторенного тракта.

Юдкиным Д.В. впервые предложен метод диагностики синдрома ломкой X-хромосомы с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*, который применен для диагностики большой выборки пациентов с подозрением на синдром ломкой X-хромосомы.

В диссертации представлено исследование активации репликации в районе ломкого сайта FRAXA и показано, что в условиях репликативного стресса происходит «недорепликация» участка увеличенного повтора. На основе полученных данных впервые предложена модель образования ломкого сайта FRAXA. В диссертационной работе впервые исследовано влияние одобренных ингибиторов деацетилаз гистонов на экспрессию гена *FMR1*.

Теоретическая значимость диссертационного исследования Юдкина Д.В. определяется полученными данными о взаимосвязи молекулярно-генетических изменений гена *FMR1* с изменениями функциональной коннективности отделов головного мозга пациентов с фраксопатиями; данными о нестабильности повтора *CGG* и разработанным индексом соматической нестабильности, а также моделью образования сайта FRAXA. Эти теоретические результаты вносят весомый вклад в понимание механизмов развития заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, и могут быть использованы для развития методов диагностики и прогнозирования течения болезней.

Диссертационная работа Дмитрия Владимировича имеет большое **практическое значение**. Разработанный соискателем метод определения ломкого сайта FRAXA успешно применяется для постановки диагноза пациентам с подозрением на синдром ломкой X-хромосомы. Данные о влиянии ромидепсина и вориностата, ингибиторов деацетилаз гистонов, вносят значительный вклад в разработку методов терапии фраксопатий и позволяют исключить из исследований неперспективные препараты.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. На основании полноты изложенных материалов, адекватно и тщательно спланированных и проведенных экспериментов, можно сделать заключение, что положения и выводы, представленные в работе, полностью обоснованы и научно достоверны. Положения, выносимые на защиту, сформулированы четко и убедительно, и отражены в соответствующих главах. Работа прошла широкую апробацию на девяти международных конференциях, а ее результаты отражены в двадцати публикациях в рецензируемых изданиях из списка, рекомендованного ВАК.

Общая характеристика работы. В целом диссертационная работа Д.В. Юдкина выполнена на высоком научном и методическом уровнях и является завершенным

комплексным исследованием, описывающим природу заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Работа написана четким понятным языком, без избыточного «научообразия».

Во *введении* автор описывает актуальность выбранной темы исследования, ставит цели и задачи, приводит положения, выносимые на защиту, демонстрирует степень апробации результатов. В разделе представлены теоретическая и практическая значимость работы и научная новизна. Поставленные задачи сформулированы четко и направлены на реализацию цели диссертационного исследования.

Обзор литературы изложен детально и свидетельствует о глубоком анализе проблематики исследования, проведенном автором. В списке литературы представлено 466 источников. Обзор литературы состоит из девяти разделов в которых описаны: природа заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой; влияние хроматина и микроРНК на патогенез этих заболеваний; соматическая нестабильность повторов CGG, ее причины и методы оценки; AUG-независимая трансляция локуса *FMR1*; природа ломкости хромосом; методы диагностики и терапии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой.

Материалы и методы описаны детально, описание позволяет воспроизвести выполненные эксперименты. Все представленные методики описаны в соответствии с общепринятыми правилами. Использованный набор методов обеспечивают комплексный подход к исследованию. Особо следует подчеркнуть подробную информацию о соблюдении всех этических норм при вовлечении в работу пациентов с фраксопатиями, а также биоэтических при работе с лабораторными животными.

Результаты представлены в главах 3-6. В частности, глава 3 посвящена подробному исследованию различных аспектов соматической нестабильности повтора CGG. Исследована соматическая нестабильность в разных тканях лабораторных животных и пациентов. Предложена схема расчёта индекса соматической нестабильности, который не зависит от эффективности амплификации увеличенного повтора. Показана взаимосвязь индекса соматической нестабильности с фенотипическими проявлениями фраксопатий и его прогностическое значение.

В четвертой главе представлена технология выявления ломких сайтов хромосом у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы с использованием флуоресцентной

гибридизации *in situ*. Этот подход позволяет достоверно определять теломерно расположенный ломкий сайт. Показан семейный клинический случай умственной отсталости, сопряженной с ломкими сайтами FRAXA и анеуплоидией.

В пятой главе автор представляет исследование ориджинов репликации в области ломкого сайта FRAXA в гене *FMRI*. На основании полученных данных предложена схема, описывающая образование редких ломких сайтов, основанная на снижении активации репликации в GC-богатых участках.

Глава 6 посвящена исследованию подходов к терапии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, путем реактивации подавленной экспрессии гена *FMRI*. Полученные данные свидетельствуют о крайне низкой реактивирующей способности ингибиторов деацетилаз гистонов при очень высокой цитотоксичности. В случае ингибиторов гетерохроматинизации, большая реактивирующая способность у ингибиторов ДНК-метилтрансфераз. Автор делает заключение о перспективности генотерапевтических методик для борьбы с фраксопатиями.

Заключение включает обобщенный анализ всех представленных результатов, их обобщение, а также демонстрирует их прикладное и фундаментальное значение для данной области науки.

Выводы сформулированы четко и полностью соответствуют задачам диссертационного исследования. Положения, выносимые на защиту, также соответствуют цели и задачам исследования.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

Диссертационная работа Д.В. Юдкина производит позитивное впечатление, однако, к её тексту есть ряд вопросов и замечаний.

Каковы современные представления о формировании соматической нестабильности у людей? С чем могут быть связаны различия степени соматической нестабильности в разных органах и её зависимость от возраста?

Исследования синдрома ломкой X-хромосомы активно проводятся во всем мире, база данных PubMed содержит более 15 тысяч публикаций, посвященных исследованиям синдрома. Непонятно, почему «Введение» к диссертации опирается на публикации пятилетней и более давности.

Использование термина «несоматические клетки семенников» некорректно. Термин никак не обоснован в диссертационной работе и, как таковой, отсутствует в научной литературе. В организме есть два типа клеток: соматические и половые.

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 завершённой работой, в которой представлены новые данные о молекулярных механизмах патогенеза заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. По своей актуальности, научной новизне, методическому уровню, объёму 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 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
группы микроскопических исследований
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Рябчикова Елена Ивановна



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

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 Елены Ивановны заверяю
Учёный секретарь ИХБФМ СО РАН
к.б.н. Логашенко Евгения Борисовна

