

В диссертационный совет ПДС 0300.027
При Федеральном государственном автономном
Образовательном учреждении высшего образования
«Российский университет дружбы народов
Имени Патриса Лумумбы»
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

ОТЗЫВ

официального оппонента, к.м.н., главного научного сотрудника,
заведующего лабораторией физиологии почки и водно-солевого обмена
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской
академии наук Кутиной Анны Вячеславовны

на диссертацию **Ганцовой Елены Александровны** на тему:

«Оценка влияния нокаута гена рецепторной тирозинкиназы IRR на
гистологическую структуру и транскриптом почки»,
представленной к защите на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальностям
1.5.22. Клеточная биология и 1.5.3. Молекулярная биология.

Актуальность темы исследования

Поддержание оптимального кислотно-щелочного равновесия внутренней среды необходимо для жизнедеятельности всех клеток организма. Регуляция уровня кислот и оснований обеспечивается множеством молекулярных механизмов, значительная часть которых до сих пор не изучены. Рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR), охарактеризован как один из сенсоров щелочного pH. Он преимущественно экспрессируется в β -вставочных клетках собирательных трубок в почках, обеспечивающих секрецию бикарбоната, что указывает на его потенциальную роль в регуляции кислотно-щелочного баланса. Еще в 2001 году была получена уникальная линия нокаутных по гену *insrr* мышей, но до настоящего времени фенотип мышей при инактивации гена *insrr* мало изучен. Несмотря на то, что почка является основным органом поддержания кислотно-щелочного состояния, а также ранее получены данные о влиянии нокаута гена *insrr* на секрецию бикарбонатов в мочу, характеристика состояния самой паренхимы почки, а также популяций вставочных клеток собирательных трубок отсутствует. Также отсутствуют важные данные о профиле экспрессии генов в почке при нокауте гена *insrr*, которые могли бы оценить вклад рецептора IRR в процессы клеточного метаболизма и клеточных сигнальных систем. В связи с этим поставленная в диссертационном исследовании цель изучить влияние инактивации гена *insrr* и кодируемого этим геном рецептора IRR на строение

почки и профиль экспрессии генов в клетках этого органа в условиях физиологической нормы и при алкалозе у мыши, представляется важной и актуальной для физиологии почек, клеточной и молекулярной биологии.

Достоверность и новизна результатов диссертации

Работа выполнена на высоком методическом уровне, соответствующем мировым исследованиям. Комплекс методов включал морфологические методы (окрашивание срезов гематоксилином и эозином, флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание маркеров вставочных клеток собирательных трубок почки, детекция макрофагов почки), методы высокопроизводительного РНК-секвенирования тотальной паренхимы почки, ОТ-ПЦР в реальном времени, биоинформатический анализ, аннотирование генов с помощью инструмента Gene Ontology. Дополнительно использован метод выделения зигот из мыши и оценка развития эмбрионов на стадии дробления до бластоцисты. Выбран корректный дизайн исследования, выровнен генетический фон животных за счет использования мышей-литтермейтсов. Проведена грамотная статистическая обработка данных. Первичные данные РНК-секвенирования депонированы в Европейский архив нуклеотидов (№ GSE200638), что повышает прозрачность исследования. Все вышеперечисленное обеспечивает достоверность полученных в работе результатов.

В диссертационной работе впервые был установлен ряд важных фактов, свидетельствующих о том, что IRR как сенсор рН является важным молекулярным участником как системы регуляции кислотно-щелочного баланса при участии почек, так и клеточного метаболизма.

Впервые была детально проанализирована функциональная морфология и транскриптом почек в норме и при инактивации гена *insrr* у мышей C57Bl/6 как в обычных условиях, так и при алкалозе. Показано, что для нокаутных животных в различных условиях, включая моделирование алкалоза, характерна типичная нормальная микроскопическая структура коркового и мозгового вещества почек, а также представленность в почках популяций CD86+ и CD206+макрофагов, α - и β - вставочных клеток собирательных трубок. Впервые показаны существенные различия в транскриптомах мышей дикого типа и нокаутов по гену *insrr*: выявлена активация генов, кодирующих рибосомальные белки и белки, обеспечивающие процессы окислительного фосфорилирования (NADH-убихинон-редуктаза, цитохром-с-оксидаза 6B1, субъединица G3 протонной АТФазы и др.), и снижение экспрессии генов, кодирующих белки мембранных транспортеров (пендрин, транспортер монокарбоксилата 1, натрий-глюкозный котранспортер 2 (SGLT2) и др.). Интересен выявленный факт, что у мышей дикого типа щелочная нагрузка (потребление бикарбоната натрия) приводила к изменениям активности транспортеров сходным с таковыми, выявленными при инактивации гена *insrr*. Впервые выявлено, что при инактивации гена *insrr* происходит снижение экспрессии гена домашнего хозяйства *gapdh*, что

подтверждено, как методом ПЦР в реальном времени, так и на белковом уровне в клетках различных органов (почки, печень, головной мозг).

Получены приоритетные данные о важной роли гена *insrr* в раннем эмбриональном периоде: инактивация рецептора IRR может приводить к остановке и ассиметричному дроблению мышинных эмбрионов и задержке развития.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа имеет традиционную структуру, изложена на 124 страницах текста и включает 30 рисунков и 9 таблиц, список литературы содержит информацию о 211 источниках.

Работа очень хорошо и логично структурирована, написана грамотным академическим языком. Результаты исследования описаны подробно, материал хорошо иллюстрирован. Все положения, выносимые на защиту, и сформулированные в диссертации выводы имеют экспериментальное обоснование, четко соответствуют поставленным задачам. Выявленные на молекулярно-генетическом уровне особенности метаболизма у мышей с инактивацией рецептора IRR подтверждены исследованиями морфофункциональных особенностей в экспериментах *in vivo*, в том числе при моделировании патологического состояния (алкалоз).

Ценность для науки и практики результатов работы

Полученные в исследовании данные расширяют фундаментальные знания о роли рецептора IRR для эмбрионального развития, о влиянии его инактивации на морфологию почек, в особенности на популяцию почечных макрофагов и вставочных клеток нефрона. Полученные данные по РНК-секвенированию паренхимы почек о повышении экспрессии генов путей энергетического обмена при инактивации гена *insrr* показывают перспективы исследований этих молекулярных механизмов при моделировании патологических состояний.

Практическая значимость работы заключается в детальной характеристике нокаутных по гену *insrr* мышей C57Bl/6, что делает возможным их использование для дальнейших фундаментальных и доклинических исследований, в частности для изучения обмена кислот и оснований в органах и биологических жидкостях, а также метаболического алкалоза и ацидоза. Полученные в работе данные о сниженной экспрессии гена домашнего хозяйства *gapdh* (подтверждено и на уровне мРНК, и белка в клетках различных органов нокаутных животных) имеет важную практическую методическую ценность, так как влияет на выбор референсного гена при анализе экспрессии генов в дальнейших исследованиях на этой модели.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

По материалам диссертации сделано 12 публикаций, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах цитирования (РИНЦ, Scopus, WoS) и рекомендованных ВАК. Результаты исследования были представлены на 6 международных и российских конференциях.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата полностью соответствует содержанию и основным положениям диссертации.

Замечания по работе

Диссертационная работа хорошо оформлена, но шрифт в подписях по осям и в легендах некоторых рисунков в диссертации и в автореферате имеют очень маленький размер, что затрудняет их восприятие. В разделе обсуждение автор не очень подробно анализирует свои данные, эта часть работы оказалась наиболее лаконичной.

В работе получены важные физиологические данные о нарушении толерантности к глюкозе у мышей-нокауты по гену *insrr*, но они почему-то не нашли отражения в выводах исследования и в положениях выносимых на защиту.

Указанные замечания не носят принципиального характера и не снижают научную значимость диссертационного исследования.

Вопросы дискуссионного характера

В работе для моделирования метаболического алкалоза у мышей был использован подход с добавлением в питьевую воду 280 мМ бикарбоната натрия в течение 7 дней. Известно ли по данным литературы или Вашим данным, меняется ли на фоне такой щелочной нагрузки потребление мышами пищи и воды? Контролировался ли объем выпитой воды за сутки животными в эксперименте? И наблюдались ли различия между мышами дикого типа и мышами-нокаутами по гену *insrr* в степени выраженности метаболического алкалоза?

Заключение

Диссертационное исследование Ганцовой Елены Александровны является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи морфологической и молекулярно-биологической характеристики почек мышей с инактивированным геном рецепторной тирозинкиназы IRR в условиях физиологической нормы и при алкалозе, имеющей большое значение для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе регуляции почками кислотно-щелочного равновесия. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к

диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, согласно п. 2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов», утвержденного ученым советом РУДН протокол № УС-1 от 22.01.2024 г., а её автор, Ганцова Елена Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.22. Клеточная биология и 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник, заведующий лабораторией физиологии почки и водно-солевого обмена Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН)

кандидат медицинских наук по специальности 03.00.13 Физиология

Кутина Анна Вячеславовна

12 сентября 2025 г.

Подпись Кутиной А. В. заверяю.

Ученый секретарь ИЭФБ РАН
кандидат биологических наук



Гальперина Елизавета Иосифовна

12 сентября 2025 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), пр. М. Тореца, 44, Санкт-Петербург, 194223
e-mail: office@iephb.ru, сайт www.iephb.ru
тел. (812) 552-79-01