



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»
(ФГБНУ «ИЭМ»)

ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376
телефон: +7 (812) 234-6868, факс: +7 (812) 234-9489, e-mail: iem@iemrrams.ru

-25-04 2016

№ 2516-70/128

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА,

доктора медицинских наук, профессора Виктора Матвеевича Клименко на диссертацию Натальи Алековны Дюжиковой «Цитогенетические и молекулярно-клеточные механизмы постстрессорных состояний», представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Диссертационная работа Н.А. Дюжиковой посвящена исследованию цитогенетических и молекулярно-клеточных механизмов влияния психоэмоционального стрессорного воздействия на формирование адаптивных и долговременных патологических постстрессорных состояний с использованием в качестве модели крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы.

Актуальность работы. Неуклонный рост в мире стрессозависимых психических заболеваний обуславливает необходимость исследования механизмов их возникновения и динамики развития с целью поиска новейших технологий лечения и профилактики. Особую актуальность в связи с этим приобретает изучение долгосрочных молекулярно-клеточных механизмов, лежащих в основе этих заболеваний, выявление генов-кандидатов, контролирующих патологические процессы. Как известно, важная роль в осуществлении пластических процессов в ЦНС и формировании патологии принадлежит функциональному состоянию нервной системы. Существование индивидуальных различий, обусловленных

генетически детерминированным функциональным состоянием нервной системы, определяет изменчивость в степени активности различных звеньев нервной системы и создает предпосылки для дифференциальной реализации нормальных и патологических процессов в ЦНС. Изменчивость в уровне возбудимости нервной системы и связанные с этим особенности реакции на стресс имеют целый ряд физиологических коррелятов и затрагивают процессы на молекулярно-клеточном уровне, что создает основу для формирования долговременных постстрессорных патологических состояний. Понимание этих процессов чрезвычайно важно не только для фундаментальной науки, но и для практического применения, в частности, его результаты могут послужить основой при разработке диагностических критериев и терапевтических средств профилактики и коррекции стресс-зависимых заболеваний.

Теоретическое и практическое значение работы заключается в том, что полученные результаты имеют значение для развития современных воззрений на механизмы формирования постстрессорных состояний с длительным течением и расшифровки лежащих в их основе генетических и эпигенетических механизмов, подтверждают вовлечение хромосомного аппарата центральных и периферических структур в реакцию на психоэмоциональный стресс и установлении долговременных изменений состояния хроматина в нейронах мозга, связанных с влиянием на экспрессию генов. Важное теоретическое и практическое значение имеет заключение о зависимости протекания молекулярно-клеточных процессов в нормальных условиях и при реакции на стресс от базового генетически детерминированного функционального состояния нервной системы организма: генетически детерминированная возбудимость нервной системы является фактором риска, определяющим специфику и динамику генетических и эпигенетических изменений в нейронах.

Новизна результатов исследования. Наиболее значимые новые результаты, представленные в диссертации следующие:

Селекция крыс по возбудимости нервной системы привела к дивергенции по цитогенетическим и молекулярно-клеточным параметрам развивающегося и зрелого мозга: количественным характеристикам общего пула интерфазного конденсированного хроматина и С-гетерохроматина, спонтанной частоте хромосомных aberrаций, экспрессии эпигенетических модификаций, полиморфизму геномного паттерна ретротранспозона L1, количеству вариаций числа копий рибосомного гена rpl13a.

Выявлены общие универсальные постстрессорные цитогенетические изменения в развивающемся и зрелом гиппокампе высоко- и низковозбудимых крыс. К ним относятся снижение площади хромоцентров, свидетельствующее об уменьшении общего количества конденсированного хроматина (С-гетерохроматина), связанное с избирательной деконденсацией, а также изменение хромоцентральной организации нейрональных ядер в результате агрегации или дезагрегации хромоцентров.

Выявлены специфические, связанные с уровнем возбудимости нервной системы, компоненты реакции на короткий эмоционально-болевым стресс хромосомного аппарата зрелых нейронов и клеток костного мозга. В нейронах высоко- и низковозбудимых крыс происходят структурные изменения хроматина, особенности проявления которых у каждой линии зависят от структуры мозга и связаны с суточным ритмом. С высокой возбудимостью нервной системы при действии стресса и при действии мутагена циклофосфана связано возрастание нестабильности хромосом в клетках костного мозга.

Выявлены долгосрочные устойчивые постстрессорные цитогенетические изменения в нейронах развивающегося и зрелого мозга крыс. Формируемые у эмбрионов постстрессорные структурные изменения хроматина сохраняются в постнатальном периоде развития и не связаны с линейными особенностями возбудимости нервной системы крыс. В зрелых нейронах гиппокампа структурные изменения хроматина сохраняются до 2-х

месяцев после стрессорного воздействия и определяются низким уровнем возбудимости нервной системы крыс.

Выявлено участие специфических эпигенетических модификаций ДНК и гистонов в реакции на длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие. Динамика их долгосрочного, до 2-х месяцев изменения в нейронах является специфичной для каждой линии и зависимой от структуры мозга. Низкая возбудимость нервной системы определяет устойчивую модификацию активности генома пирамидных нейронов, связанных с деконденсацией хроматина, последовательным снижением содержания метилцитозин-связывающего белка и повышением ацетилирования гистона H4 в гиппокампе и стабильным повышением ацетилирования гистонов H3 и H4 в сенсомоторной зоне коры головного мозга. Высокая возбудимость нервной системы опосредует не связанное с общим изменением конденсации хроматина последовательное повышение фосфорилирования и метилирования гистона H3 в гиппокампе и разнонаправленное изменение ацетилирования гистонов H3 и H4 и фосфорилирования гистона H3 в сенсомоторной зоне коры головного мозга.

Структура диссертации традиционна и содержит введение (17 стр.), обзор литературы (66 стр.), описание материалов и методов исследований (20 стр.), результаты исследования и обсуждение результатов (66 стр.), заключение и выводы (6 стр.). В представленном виде рукопись содержит 246 машинописных страниц текста, 22 рисунка, 50 таблиц, 683 литературных ссылок.

Во **введении** обосновывается актуальность выбранного направления исследования, степень разработанности проблемы, формулируются цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту, описывается новизна полученных экспериментальных данных, обосновывается их теоретическое и практическое значение, приводятся сведения о методологии и методах исследования, степени достоверности результатов, апробации результатов.

Обзор литературы достаточно полно отражает современное состояние проблемы и содержит несколько разделов, в которых изложены современные представления о стрессе и постстрессорной патологии, сведения о влиянии возбудимости нервной системы на функции мозга и поведение. Рассматриваются генетические, цитогенетические и молекулярно-клеточные механизмы действия стресса, а также эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов в мозге.

Раздел **материал и методы исследования** содержит полную информацию о линейных животных, использованных методах исследования. Работа выполнена на экспериментальной модели- линиях крыс с контрастными параметрами возбудимости нервной системы, созданных и поддерживаемых отбором в лаборатории генетики ВНД Института физиологии им. И.П. Павлова. Использована известная схема эмоционально-болевого стрессорного воздействия, рассматриваемая автором как психоэмоциональный стресс, примененная как в период развития эмбрионов (стресс матери) на стадиях формирования определенных структур мозга, так и у взрослых, половозрелых животных. Комплексное исследование механизмов развития постстрессорных состояний проведено с использованием широкого арсенала адекватных физиологических, цитогенетических, молекулярно-клеточных и современных, высокоточных молекулярно-генетических методов, что является достоинством представленной диссертационной работы.

В **экспериментальной части** работы содержится подробное описание полученных результатов, которые проиллюстрированы диаграммами , таблицами, микрофотографиями . Эта глава хорошо структурирована, данные распределены по разделам и изложены в последовательности , соответствующей логике дальнейшего обсуждения. Получены данные, дополняющие известные характеристики линий ВП и НП цитогенетическими , молекулярно-клеточными, молекулярно-генетическими

характеристиками развивающегося и зрелого мозга: количественным характеристикам хроматина, частоте хромосомных aberrаций, экспрессии эпигенетических модификаций, полиморфизму геномного паттерна ретротранспозона L1, количеству вариаций числа копий рибосомного гена *rpl13a*, которые связаны с параметрами возбудимости нервной системы.

Автором получены также важные результаты, свидетельствующие о том, что с высокой возбудимостью нервной системы при действии стресса и при действии мутагена циклофосфана связано возрастание нестабильности хромосом в клетках костного мозга.

В представленной работе автору удалось также выявить цитогенетические параметры клеточного ядра в развивающемся и зрелом гиппокампе высоко- и низковозбудимых крыс, изменения которых вызваны влиянием стресса (снижение площади хромоцентров, изменение хромоцентральной организации ядра). И далее те эпигенетические изменения, которые могут быть связаны с ними – метилирование ДНК и гистонов, ацетилирование и фосфорилирование гистонов.

Имеют большое фундаментальное значение результаты о долгосрочных (до 2-х месяцев после воздействия) устойчивых постстрессорных цитогенетических изменениях в нейронах развивающегося и зрелого мозга крыс.

Можно сказать, что эта работа представляет собой первый этап расшифровки нейронального эпигенетического кода у высоковозбудимых и низковозбудимых крыс, а также его изменения под влиянием стресса, при формировании постстрессорных патологических состояний, особенности проявления которых зависят от базового генетически-детерминированного уровня возбудимости нервной системы животных.

В главе «**Обсуждение результатов**» полученные данные обобщаются, дается их интерпретация. Этот раздел диссертации логично подводит к **выводам**, обоснованным полученными результатами исследования, которые отражают суть положений, выносимых на защиту.

Достоверность и обоснованность положений и выводов.

Достоверность представленных в диссертации материалов не подлежит сомнению. Это обусловлено достаточным объемом проведенных исследований на репрезентативных выборках животных с привлечением современных методов, соответствующих выдвинутым задачам, а также адекватных методов статистической обработки.

Все результаты, представленные на защиту, получены либо лично диссертантом, либо при его непосредственном участии. По материалам диссертации опубликовано 55 научных работ, включая 18 статей в рецензируемых журналах. Результаты исследований многократно обсуждались на конференциях, конгрессах и симпозиумах всероссийского и международного масштаба.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации.

У меня нет серьезных **замечаний** по сути работы, однако возникает ряд вопросов.

1. В работе исследованы нейроны гиппокампа и сенсомоторной зоны коры головного мозга. А при ПТСР страдают также клетки префронтальной коры и базолатеральной области миндалины. Есть ли какая-либо информация об изучаемых характеристиках в заданных экспериментальных условиях в этих структурах мозга и как они связаны с возбудимостью нервной системы?
2. Вы утверждаете, что «в клетках костного мозга высокая возбудимость нервной системы определяет постстрессовое увеличение частоты хромосомных aberrаций и более сильную чувствительность к действию мутагена циклофосфана». Однако проведенные Вами эксперименты не дают возможность установить причинно-следственные связи. Возможно ли, что именно «предрасположенность» к хромосомным aberrациям определяет возбудимость нервной системы?
3. Возможно ли на молекулярно-клеточном уровне выделить особенности реакции клеток ЦНС на эмоциональный и эмоционально-болевого стресс?

4. Проводилось ли определение пола эмбрионов при действии материнского стресса и не могли бы повлиять гендерные различия на цитогенетические характеристики клеток развивающегося гиппокампа?
5. В каких именно зонах развивающегося гиппокампа происходит пролиферация на изученных сроках?
6. С какими еще формами поведения могут быть связаны обнаруженные Вами цитогенетические и молекулярно-клеточные изменения в клетках мозга?
7. Какие возможные методы коррекции исследуемой патологии можно было бы предложить на основании результатов, представленных в работе?
8. Каковы перспективы этих исследований с теоретической и практической точки зрения, учитывая, что современный уровень предполагает проведение анализа на уровне генома, эпигенома, транскриптома?

Эти вопросы хотелось бы обсудить в дискуссии. Высказанные замечания не снижают общей положительной оценки работы.

Заключение. Диссертация Дюжиковой Н.А. «Цитогенетические и молекулярно-клеточные механизмы постстрессорных состояний» содержит фундаментальное решение важной научной проблемы – расшифровки конкретных клеточных, генетических и эпигенетических механизмов, лежащих в основе долговременных изменений мозговых функций после повреждающих стрессорных воздействий и их зависимость от уровня возбудимости нервной системы. Актуальность тематики диссертационного исследования и научно-практическое значение полученных результатов не вызывает сомнений и следует непосредственно из постановки задач. По своей актуальности, степени обоснованности положений и выводов, достоверности результатов, новизне, научной и практической значимости диссертационное исследование Н.А. Дюжиковой «Цитогенетические и молекулярно-клеточные механизмы постстрессорных состояний», представленное к защите на соискание ученой степени доктора

биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология, представляет собой законченный самостоятельно выполненный научный труд. Таким образом, можно заключить, что диссертационная работа Н.А. Дюжиковой полностью соответствует требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года), а ее автор Дюжикова Наталья Алековна достойна присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Заведующий Физиологическим отделом им. И.П. Павлова,
заведующий лабораторией нейробиологии
интегративных функций мозга,
ФГБНУ Института экспериментальной медицины,
доктор медицинских наук, профессор

Клименко В.М.

25.04.2016.

Подпись Клименко В.М.
Удостоверяется
/ Нач. отд. кадров



Сведения об авторе отзыва :

Фамилия, имя, отчество: Клименко Виктор Матвеевич.

Ученая степень: доктор медицинских наук.

Ученое звание: профессор.

Должность : заведующий отделом, заведующий лабораторией

Структурное подразделение: Физиологический отдел им. И.П. Павлова,

Лаборатория нейробиологии интегративных функций мозга.

Учреждение: ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.

Почтовый адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12.

Тел.: 8(812)234-99-37

E-mail: klimenko_victor@mail.ru