

ОТЗЫВ
официального оппонента доктора биологических наук, доцента
Кузнецовой Татьяны Владимировны
на диссертационную работу Дюжиковой Натальи Алековны
"Цитогенетические и молекулярно-клеточные механизмы постстрессорных
состояний", представленную на соискание ученой степени доктора
биологических наук по специальности
03.03.01- физиология

Актуальность темы. Диссертация Дюжиковой Н.А. посвящена актуальной проблеме современной биологии и медицины – изучению механизмов реакции на стресс и формирования долгосрочных постстрессорных патологических состояний. К настоящему времени определены гены, которые участвуют в развитии разных форм стресс-зависимых заболеваний, получены данные об особенностях эпигенетических модификаций ДНК и гистоновых белков в клетках отдельных структур мозга, обсуждается роль мобильных элементов в индуцированном стрессом мутагенезе и регуляции работы генома. Однако, сроки формирования и сохранения изменений в структуре ДНК и хроматина в клетках центральных и периферических органов, механизмы взаимодействия на уровне целого мозга и отдельных систем, проявление этих изменений при разных формах и симптомах постстрессорных состояний на фоне индивидуального генома, не выяснены. Особый интерес представляет исследование генетических и эпигенетических процессов в гиппокампе – структуре мозга, являющейся мишенью действия стресса, связанной с механизмами обучения и памяти, формированием и регуляцией биологических ритмов и зоны новой коры больших полушарий мозга (сенсомоторной), ответственной за целый ряд моторных и других элементов поведенческого репертуара в норме и при патологиях. Понимание фундаментальных основ и патогенеза тревожно-депрессивных и посттравматических стрессовых расстройств крайне важно для поиска универсальных и специфических маркеров, которые могут быть использованы для дифференциальной диагностики, прогнозирования и профилактики постстрессорных патологических состояний. Следует особо подчеркнуть, что их исследование в контексте связей с функциональным состоянием нервной системы и индивидуальными особенностями свойств нервных процессов является

своевременным, новым и актуальным для развития подходов предиктивной персонифицированной медицины. Вместе с тем, изучение механизмов формирования и сохранения посттравматических стрессовых расстройств реально только на экспериментальных моделях.

Таким образом, актуальность темы диссертации Дюжиковой Н.А., целью которой явилось комплексное исследование механизмов влияния психоэмоционального стрессорного воздействия разной интенсивности и продолжительности на формирование адаптивных и долговременных патологических постстрессорных состояний у крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы, не вызывает сомнений.

Научная новизна результатов исследования. Использование уникальной модели (линий крыс с высокой и низкой возбудимостью нервной системы) позволило вычленить долгосрочные эффекты действия эпигенетических механизмов психоэмоционального стресса в цепи событий (реорганизация хроматина, модификации ДНК и гистонов, активность ретротранспозонов в клетках зрелого мозга), и оценить вклад индивидуальной изменчивости по возбудимости нервной системы в эти процессы.

Впервые выявлены универсальные и специфические цитогенетические и молекулярно-клеточные механизмы реакции клеток развивающегося и зрелого мозга на психоэмоциональный стресс в динамике их долгосрочного изменения и/или сохранения до 2-х месяцев после воздействия.

Впервые изучена роль индивидуальных различий по возбудимости нервной системы в протекании цитогенетических и тонких эпигенетических процессов в клетках различных структур мозга после действия психоэмоционального стресса, что позволило выделить факторы риска и подойти к пониманию молекулярно-клеточных механизмов формирования устойчивых патологических постстрессорных состояний организма.

Впервые выявлены зависимые от генетически детерминированного уровня возбудимости нервной системы цитогенетические, молекулярно-клеточные и молекулярно-генетические процессы непосредственно в нервных клетках различных структур мозга. Это дополнило спектр коррелятов, связанных с уровнем возбудимости нервной системы компонентами молекулярно-клеточного уровня.

Впервые показана зависимость мутагенного эффекта эмоционально-болевого стресса и чувствительности к действию мутагена циклофосфана в клетках костного мозга от генетически-детерминированных характеристик возбудимости животных.

Теоретическая и практическая значимость определяются полученными сведениями о пролонгированных эффектах психоэмоционального стресса, проявляющихся на цитогенетическом и эпигенетическом уровнях и составляющих основу патогенеза стресс-зависимых заболеваний. Проведенные исследования расширяют спектр доказательств концепции о системном контроле генетических и цитогенетических процессов и обогащают ее молекулярно-генетическую основу. Полученные результаты имеют значение для развития современных взглядов на механизмы формирования постстрессорных состояний с длительным течением и расшифровки лежащих в их основе генетических и эпигенетических механизмов. Теоретическая значимость проведенного исследования заключается в подтверждении вовлечения 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. Эти результаты расширяют современные представления о механизмах нейрональной пластичности, лежащих в основе изменения адаптивных возможностей организма к неблагоприятным воздействиям экстремального характера. Пластичность генома нейронов обеспечивается модификациями ДНК и гистонов, транспозициями мобильных элементов, специфичность которых определяется генетически-детерминированными механизмами чувствительности к восприятию стрессорных факторов и предрасположенности к формированию стресс-зависимых патологических состояний.

Подтверждена гипотеза дифференциальных постстрессорных модификаций хромосом - различный паттерн эпигенетических изменений в разных отделах мозга при действии экстремальных факторов вносит вклад в развитие синдрома дезинтеграции, определяющего патогенез постстрессорных патологий с длительным течением (Вайдо, 2000). Возбудимость нервной системы влияет на качественные характеристики этого процесса и лежит в основе индивидуальных различий.

Важное 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 временную динамику генетических и эпигенетических изменений в нейронах.

Продемонстрированные цитогенетические эффекты мутагена циклофосфана и стресса имеют **практическое значение** для обоснования подходов к определению индивидуальной чувствительности организма к действию генотоксикантов. Полученные в работе факты могут быть положены также в основу разработки методов профилактики и коррекции патологических постстрессорных состояний с учетом базовых генетических механизмов, лежащих в основе их патогенеза. Следует отметить также включение в GenBank данных сиквенса последовательностей гена *grin1*, определение высокой гомологии ретротранспозону L1 и анализ числа копий генов *grin1*, *ywhaz*, *gapdh*, *rpl13a*.

Полученные результаты и выводы работы могут быть использованы для чтения курсов лекций по физиологии, нейробиологии, нейрогенетике, нейроэпигенетике, генетике развития для студентов биологических и медицинских специальностей.

Достоверность и обоснованность выводов. Экспериментальные данные получены на достаточно большом объеме животных (более 700 особей, 100 эмбрионов) с использованием комплекса традиционных цитогенетических и современных молекулярных и иммуногистохимических методов исследования. Арсенал использованных методов исследования адекватен поставленным задачам. Полученные данные тщательно статистически обработаны, обдуманы. Поэтому достоверность и обоснованность материалов диссертации не вызывает сомнения.

Структура диссертации. Работа построена по традиционному плану, состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материал и методы, результаты, обсуждение), заключения и выводов. Работа изложена на 246 стр, включает 50 таблиц 22 рисунками. Список цитированной литературы включает 683 источника (149 отечественных и 534 – иностранных).

Работа хорошо структурирована и оформлена, иллюстрирована информативными микрофотографиями. Удачно представлены также данные в таблицах. Все разделы читаются с большим интересом, так как написаны эмоционально, четко, хорошим, свободным русским языком.

Обзор литературы (62 стр.) содержит 3 раздела, написан обстоятельно, дает полное представление о состоянии проблемы и свидетельствует о широкой эрудции соискателя и глубоком знании и анализе данных по теме диссертации, опубликованных с 70-х гг. прошлого века по н.в.:

В первом разделе обзора рассматриваются общие представления о стрессе и постстрессорных патологиях. Второй раздел посвящен аспектам возбудимости ее влияния как основного параметра функционального состояния нервной системы на функции мозга и поведение. В этом разделе подробно рассмотрены все возможные модели для изучения процессов реакции на стресс.

Большое внимание (3-й раздел обзора) уделено современным представлениям о генетических, цитогенетических и молекулярно-клеточных механизмах действия стресса в формировании постстрессорных состояний. Всесторонне рассмотрены все имеющиеся к настоящему времени сведения об особенностях организации хроматина, дана цитогенетическая характеристика хромосом крыс, а также эпигенетические особенности регуляции экспрессии генов в мозге.

В главе **Материал и методы** дано описание линий крыс и особенности методов исследования материала, полученного от взрослых особей и эмбрионов. Благодаря фотографиям не только результатов, которые получала Наталья Александровна с использованием различных методов, но и аппаратной базы, глава оказалась очень интересной для чтения.

В главе **Результаты** последовательно изложены полученные экспериментальные данные. Фактически каждый подраздел этой главы сопровождается небольшим введением, в котором подчеркиваются особенности выполненного этапа работы. Каждый подраздел завершается резюме, что способствует лучшему пониманию и анализу полученных в работе данных.

Все данные обстоятельно всесторонне обсуждены в соответствующем разделе диссертации (глава **Обсуждение**).

В Заключении суммированы и концептуально представлены основные результаты работы.

Выводы сформулированы корректно.

Основные положения работы опубликованы в журналах, рекомендуемых ВАК представлены на многочисленных конференциях и съездах. По теме диссертации опубликовано 18 статей в рецензируемых журналах и 19 – в сборниках научных трудов и материалах конференций.

Автореферат полностью отражает содержание работы.

Принципиальных замечаний к полученным результатам, тексту диссертации и её оформлению нет. Вместе с тем, при чтении возникли небольшие **замечания и вопросы**:

1. К сожалению, в обзоре литературы отсутствуют характеристики гетерохроматина и входящих в их состав повторяющихся последовательностей ДНК. По-видимому, это обусловлено немногочисленностью сведений о структурной организации хромосом и архитектуре генома у крыс вообще и линий крыс, использованных в настоящей работе в частности. Интерес к конститутивному гетерохроматину и сателлитным ДНК обусловлен их транскрипцией, обнаруженной в ответ на стресс (в частности, под действием теплового шока в культурах клеток человека и, предположительно, под действием физиологического стресса). Интенсивные исследования значения транскриптов прицентромерной ДНК в развитии проводятся на мышах. В свете индуцированных эмоционально-болевым стрессом изменений транскрипции этот вопрос в литературе не рассматривается. Остается лишь надеяться, что в ближайшее время этот пробел будет ликвидирован, поскольку крыса является часто используемым экспериментальным объектом в биомедицинских исследованиях, моделью при изучении комплексных болезней человека, а также, как убедительно показывает работа Н.А.Дюжиковой, развития стресс-зависимых заболеваний.

2. В главе Материал и методы не упомянут метод FISH, который использован в работе. Между тем, на рис.16 (рис.19 в Автореферате) представлены результаты *in situ* гибридизации соматических хромосом крысы с ORF-фрагментом ретротранспозона LINE1, демонстрирующие распространение L1 в геноме крысы *Rattus norvegicus*. Вопросы – из каких клеток получены метафазные хромосомы,

были ли какие-то особенности проведения FISH и пытались ли оценить этим методом влияние стресса?

3. Следует отметить, что пол и возраст человека, подвергнутого психотравматизации, оказывает влияние на течение заболевания, особенности патологических последствий. В связи с этим вопросы - Известно ли что-то про пол-специфические различия в организации гетерохроматина в разных клетках у крыс на разных стадиях онтогенеза и особенности эпигенетических модификаций ДНК и гистонов, в т.ч. в ответ на стресс? Почему исследование проведено только на самцах крыс линий, селектированных по уровню возбудимости нервной системы и эмбрионах крыс, полученных от самок крыс тех же линий? При этом пол эмбрионов не учитывался?

4. В обзоре литературы приведены данные о «горячих точках» на хромосомах крыс, в которых часто происходят хромосомные перестройки. Есть ли какие-либо данные о преимущественной локализации «уязвимых» к стрессу участков хромосом? Есть ли специфика мутагенного эффекта эмоционально-болевого стресса не только по числу и спектру хромосомных аберраций, но и по локализации в хромосомах? Поскольку результаты исследований на модельных животных невозможно в полной мере экстраполировать на человека, такие данные могли бы быть полезны (с учетом секвенирования геномов и синтезии) для более пристального внимания при исследованиях на человеке.

5. Еще про экстраполяцию данных на человека. Если многоплодная беременность для крыс - норма, то для человека - патология. Наверно, стрессовые факторы при беременности должны по-разному влиять на плодов в зависимости от их числа в матке. Можно ли отнести многоплодие к физиологическим факторам стресса у человека?

6. В последнее время активно обсуждается вопрос о трансгенерационном переносе постстрессорных эпигенетических изменений хроматина и их влиянии на потомков. В диссертации убедительно показано сохранение модификаций при воздействии на беременных самок. Планируете ли в дальнейшем попытаться, учитывая богатый опыт и наличие удобной модели, попробовать разобраться более детально в этом вопросе?

7. Интересным направлением также является разработка подходов к профилактике и коррекции патологических постстрессорных состояний. Интересно узнать мнение соискателя о реальном состоянии исследований в этой области на модельных животных и на человеке.

Высказанные замечания носят дискуссионный характер, не затрагивают существа работы и не умаляют ее достоинств.

Заключение.

Таким образом, по актуальности, объему выполненных исследований, новизне и теоретической значимости, а также практической ценности результатов, их всестороннему обсуждению, обоснованности выводов диссертационная работа "Цитогенетические и молекулярно-клеточные механизмы постстрессорных состояний", выполненная Натальей Алековной Дюжиковой, представляет собой законченный научный труд, вносящий вклад в понимание механизмов патогенеза и манифестации постстрессорных патологических состояний у млекопитающих. 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.

Доктор биологических наук, доцент,
ведущий научный сотрудник лабораториипренатальной диагностики
врожденных и наследственных заболеваний
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт акушерства,
гинекологии и репродуктологии им.Д.О.Отта»
(ФГБНУ «НИИАГиР им.Д.О.Отта»)
199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3
+7 (812) 328-02-62; м 328-98-09

tkuznetzova@mail.ru

Кузнецова Татьяна Владимировна



Зам. директора по научной работе
ФГБНУ «НИИАГиР им.Д.О.Отта»
д.м.н., профессор, з.д.н. РФ

Тарасова Марина Анатольевна

11 апреля 2016 г.