

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Мухиной Ирины Васильевны на диссертационную работу Дюжиковой Натальи Алековны на тему «Цитогенетические и молекулярно-клеточные механизмы постстрессорных состояний», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук в специализированный диссертационный Совет Д 002.020.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН по специальности 03.03.01 – физиология

**Актуальность избранной диссертантом темы.** Диссертационное исследование Дюжиковой Н.А. посвящено изучению молекулярно-клеточных механизмов физиологических адаптивных и долговременных патологических постстрессорных состояний после психоэмоционального стрессорного воздействия. Одним из подходов к решению этой задачи является исследование цитогенетических (уровень хромосомных aberrаций, состояние хроматина) и молекулярно-клеточных, генетических и эпигенетических механизмов постстрессорного состояния. В этом отношении большой интерес для исследователей на современном этапе представляет изучение генетических и эпигенетических механизмов в зависимости от уровня возбудимости нервной системы. В работах последних лет убедительно продемонстрировано, что изменчивость в уровне возбудимости нервной системы и связанные с этим особенности реакции на стресс имеют целый ряд физиологических, биохимических, нейроэндокринных коррелятов, выявлен ряд генов и эпигенетических модификаций в отдельных структурах мозга, связанных с развитием разных форм постстрессорных патологий. Однако, возможности для подобных исследований на мозге человека ограничены, а модели на животных и тест-системы разнообразны, результаты зачастую противоречивы и разрозненны. Нет в литературе ответов на такие вопросы, как: каковы сроки формирования и сохранения изменений, характер их полиморфизма, специфичность их проявления в связи с

разными формами и симптомами постстрессорных патологических состояний, каково взаимодействие этих механизмов на уровне целого мозга и отдельных систем, влияние на них индивидуальных особенностей свойств нервных процессов. Следует особо подчеркнуть, что их исследование в контексте связей с функциональным состоянием нервной системы является своевременным, новым и актуальным для развития подходов предиктивной персонализированной медицины, что позволяет рассматривать тему диссертационного исследования Дюжиковой Н.А. весьма актуальной.

Основываясь на немногочисленных данных литературы о генетических и эпигенетических механизмах тревожно-депрессивных расстройств и посттравматического стрессового расстройства, Дюжикова Н.А. поставила целью своей работы изучить цитогенетические (уровень хромосомных aberrаций, состояние хроматина) и молекулярно-клеточные, генетические и эпигенетические механизмы влияния психоэмоционального стрессорного воздействия разной интенсивности и продолжительности на формирование адаптивных и долговременных патологических постстрессорных состояний у крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы.

Цель сформулирована четко и понятно. В соответствии с объявленной целью поставлено 7 последовательных задач, каждая из которых относится к отдельному целостному фрагменту исследования – (1) оценка молекулярно-биологических параметров предрасположенности к развитию постстрессорных состояний; (2) оценка уровня хромосомных aberrаций и состояние хроматина (С- гетерохроматина) в клетках развивающегося гиппокампа крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы, в нормальных условиях и после пренатального эмоционально-болевого стрессорного воздействия; оценка влияния эмоционально-болевого стрессорного воздействия (короткого и длительного) у зрелых крыс линий, различающихся по уровню возбудимости нервной системы, на: (3) частоту хромосомных aberrаций в костном мозге мутагена циклофосфана, (4) на состояние хроматина (С-гетерохроматина) нейронов разных структур мозга: гиппокамп, сенсомоторная зона коры, (5) состояние хроматина (С-гетерохроматина) и его эпигенетические

модификации, связанные с содержанием метилцитозинсвязывающего белка-MeCP2, 5- метилцитозина, ацетилирования гистонов H3 и H4, метилирования и фосфорилирования гистона H3 в нейронах гиппокампа и сенсомоторной зоны коры в динамике долгосрочных изменений до двух месяцев после воздействия; (6) оценка влияния суточной активности на спонтанное и связанное со стрессом состояние хроматина (С-гетерохроматина) в гиппокампе; (7) изучение паттерна полиморфизма ретротранспозона LINE1 (L1) и индуцированные эмоционально-болевыми стрессорными воздействиями инсерции L1 в ген *grin1* ключевой субъединицы NR1 NMDA рецептора, а также количество вариаций числа копий гена *grin1* в геномной ДНК, выделенной из гиппокампа и костного мозга.

Следует признать, что столь детальное и разностороннее исследование, проводимое параллельно, весьма целесообразно для комплексной оценки взаимосвязи генетических особенностей индивидуума и характера ответной реакции организма на стрессорное воздействие.

**Степень обоснованности научных положений и выводов представляемой работы.** Высокая степень обоснованности научных положений и выводов работы обусловлена, прежде всего, выбором методологии настоящего исследования, которая является развитием идей экспериментальной генетики высшей нервной деятельности школы И.П. Павлова и сравнительной генетики поведения и физиологической генетики школы М.Е. Лобашева. Материал для работы получен селекционным методом, применен сравнительно-генетический подход к анализу результатов. Линии крыс, прошедшие длительную селекцию по высокому и низкому порогу возбудимости нервной системы, являются уникальной моделью влияния психоэмоционального стресса на формирование постстрессорных патологических состояний, позволяющей оценить вклад индивидуальной изменчивости по возбудимости нервной системы в эти процессы. В работе использованы стандартные этологический, цитогенетические методы анализа частоты хромосомных aberrаций и количественных характеристик хроматина, морфологические методы,

иммуноцитохимический подход к анализу эпигенетических изменений в клетках различных структур мозга. Использован метод полимеразной цепной реакции для исследования вариаций количества копий генов и инсерций транспозонов. Изучение хромосомных нарушений в клетках разных тканей позволило расширить существующие теоретические положения о влиянии особенностей функционального состояния нервной системы на характеристики генетического аппарата, оценить влияние психоэмоционального стресса на нестабильность генома и его долгосрочные последствия. Полученные результаты позволили сформулировать положение о том, что генетически-детерминированный уровень возбудимости нервной системы является фактором риска развития постстрессорных патологических состояний и определяет специфику их проявления, обеспечиваемую различными цитогенетическими и молекулярно-клеточными механизмами.

**Достоверность положений и выводов диссертации.** При детальном знакомстве с рукописью достоверность представленных в работе материалов не вызывает сомнений. Экспериментальные данные, приведенные в диссертации Дюжиковой Н.А., получены на достаточном экспериментальном материале (линий крыс, прошедших более 70 поколений отбора) адекватными и оригинальными методами молекулярно-генетических исследований, грамотно статистически обработаны. Для обработки результатов применялись стандартные программные пакеты Statgraphics Centurion XV11 и Statistica 6.0. Для сравнения данных использованы критерии Стьюдента и Фишера, методы однофакторного дисперсионного анализа, многофакторного дисперсионного анализа. При отклонении распределения значений от нормального, использованы также непараметрические критерии Вилкоксона, Манна-Уитни. Различия между группами считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ . На основании полученных данных сделано 7 обоснованных выводов.

**Научная новизна.** Автором диссертационной работы впервые исследованы универсальные и специфические цитогенетические и молекулярно-

клеточные механизмы реакции организма линейных животных (крыс) на психоэмоциональный стресс в динамике их долгосрочного (до 2-х месяцев) изменения и/или сохранения после воздействия. Выявлены индивидуальные различия по вкладу возбудимости нервной системы в протекание цитогенетических и тонких эпигенетических процессов в клетках различных структур мозга после действия психоэмоционального стресса у экспериментальных животных. В частности, определены постстрессорные изменения хроматина нервных клеток, зависимые и независимые от исходного базового уровня возбудимости нервной системы животных. Впервые выявлена универсальная закономерность в реакции на эмоционально-болевого стрессорное воздействие со стороны хромосомного аппарата нейронов, проявляющаяся в снижении площади хромоцентров, не зависящая от возраста и характеристик возбудимости нервной системы крыс.

Автором впервые показано, что уровень возбудимости нервной системы взрослых животных и суточные ритмы влияют на свойства хроматина нейронов в реакции на стресс. Выявлено участие эпигенетических модификаций - метилирования ДНК, ацетилирования гистонов H3 и H4, фосфорилирования и метилирования гистона H3 по активаторным сайтам в долгосрочной реакции на эмоционально-болевого стресс в разных структурах мозга. Динамика их долгосрочного изменения в нейронах является специфичной для каждой линии животных.

Впервые выдвинута концепция о зависимости развития постстрессорных патологических состояний, регулируемых различными цитогенетическими и молекулярно-клеточными механизмами, от генетически-детерминированного уровня возбудимости нервной системы.

Продемонстрировано протективное действие эмоционально-болевого стресса, снижающего последствия мутагенного влияния циклофосфана.

**Практическая значимость.** Полученные результаты о генетических и эпигенетических механизмах формирования постстрессорных изменений поведения животных имеют практическое значение для развития современных

терапевтических подходов к коррекции постстрессорных состояний. Вывод о том что генетически детерминированная возбудимость нервной системы является фактором риска, определяющим специфику и временную динамику генетических и эпигенетических изменений в нейронах, определяет профилактику постстрессорной патологии, разработку методов повышения адаптивных возможностей организма к неблагоприятным воздействиям экстремального характера.

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 будут положены также в основу разработки методов профилактики и коррекции патологических постстрессорных состояний с учетом базовых генетических механизмов лежащих в основе их патогенеза.

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.

**Специальность, которой соответствует диссертация.** Диссертационная работа Дюжиковой Н.А. соответствует специальности 03.03.01 - физиология, так как исследование посвящено изучению функционирования организма с использованием физиологических, генетических и молекулярно-биологических подходов для анализа функций организма. Основным методом изучения в диссертационной работе Дюжиковой Н.А. является эксперимент на животных, что позволяет понять закономерности функционирования организма и его отдельных систем, принципы сохранения здоровья человека, его адаптивные возможности в различных условиях жизнедеятельности, закономерности взаимодействия организма с окружающей средой. Работа относится к областям физиологии, касающихся изучения механизмов генетических и молекулярных процессов, определяющих динамику

физиологических функций на различных стадиях развития организма на уровне клеток и тканей; физиологических механизмов адаптации человека к различным стрессорным условиям; механизмов биоритмов физиологических процессов.

**Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных автором.** Данные диссертационного исследования Дюжиковой Н.А. широко обсуждались на Всероссийских конференциях, в меньшей степени на международных зарубежных съездах и конференциях. Они полностью опубликованы в открытой печати, из которых 18 статей в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК РФ.

Анализ содержания автореферата показывает, что он соответствует содержанию диссертации и полностью отображает ее теоретические и практические положения.

**Структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 246 страницах и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материал и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы, включающий 683 работы (149 - отечественных, 534 - иностранных источника). Содержит 22 рисунка и 50 таблиц.

В первой главе «Обзор литературы» приведены сведения об основных известных механизмах стресса, постстрессорных патологий, дано определение возбудимости как основного параметра функционального состояния нервной системы. Обзор литературы заканчивается главой, в которой очень подробно даны современные представления о генетических, цитогенетических и молекулярно-клеточных механизмах формирования постстрессорных состояний, что является логичным переходом к методам и результатам собственного исследования.

Во второй главе «Материалы и методы исследования» изложены общая характеристика объектов исследования, а также использованные в работе методы, включая моделирование стресса путем метода неизбежного эмоционально-болевого стрессирования (ЭБС). Основу использованного в

диссертации оригинального методического молекулярно-клеточного подхода составляет совмещение традиционных (гистология, цитогенетические методы, иммуногистохимические методы) и современных методов (молекулярно-генетические, иммуноцитохимические) исследования.

Безусловным достоинством работы является изучение конденсации хроматина, что связано с эпигенетическими модификациями ДНК и гистонов, исследование которых в разных структурах мозга, их клеточного распределения и особенностей экспрессии представляется адекватным с применением методов иммуноцитохимии.

Таким образом, очевидно, что диссертационное исследование выполнено на хорошем уровне с привлечением разнообразных, сложных и современных методов исследования. Комбинация использованных в работе методов и подходов полностью соответствует целям и задачам исследования.

Третья глава содержит описание полученных результатов. Экспериментальный материал представлен достаточно подробно и хорошо проиллюстрирован наглядными рисунками и таблицами. Положительным моментом, облегчающим восприятие разнообразного материала, является акцентирование перед каждой подглавкой задачи, решение которой иллюстрируется последующим материалом. В конце каждой подглавки приводится сравнение полученных результатов с предыдущими.

Полученные данные обсуждаются автором в 4-ой главе в свете современных представлений о молекулярно-клеточных и генетических механизмах развития постстрессорных состояний.

Завершается диссертационная работа Заключением, где в лаконичной форме обобщены проведенные исследования, полученные результаты и обоснованы сделанные выводы.

Диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, написана хорошим научным языком, построение работы традиционное.

**В качестве замечаний и вопросов по диссертации необходимо отметить следующее:**



1. Несмотря на указание методов статистики в разделе «Материалы и методы» при описании результатов в Главе 3 в большинстве случаев нет указания в подтабличных и подрисуночных обозначениях на выбор критерия определения достоверности различий, что при отсутствии указания числа экспериментов затрудняет оценку статистической обработки данных.

2. Каков предполагаемый физиологический механизм дестабилизации генома нервных клеток мозга плода в виде увеличения частоты хромосомных нарушений и снижения площади конденсированного хроматина и С-гетерохроматина при эмоционально-болевым стрессорном воздействии на беременных самок в последний триместр? Что нового Вы внесли в понимание механизмов пре- и постнатального развития мозга? Проводили ли Вы корреляцию с функциональной активностью мозга новорожденных и выявленных Вами изменений хроматина в течение 1 месяца? Сохраняются ли эти изменения у взрослых животных?

3. Каков предполагаемый физиологический механизм протекторного действия однократного эмоционально-болевого воздействия на мутагенный эффект циклофосфана?

4. Выявленные зависимости между особенностями возбудимости, цитогенетическими и молекулярными параметрами нейронов, возрастом крыс легли в основу выводов. Однако в работе не проведена статистика корреляционных взаимосвязей, поэтому автору приходится говорить только о предположении или о возможности выявленных закономерностей.

5. Несмотря на длительный период проведения исследований и получения результатов (с 1994 года) по теме диссертации нет публикаций в высокоимпактных иностранных журналах. Почему?

**Заключение.** Принимая во внимание актуальность выполненной работы, ее научную новизну, обоснованность выводов, а также их существенную теоретическую и практическую значимость, можно заключить, что диссертация Дюжиковой Натальи Алековны на тему «Цитогенетические и молекулярно-клеточные механизмы постстрессорных состояний», соответствует требованиям

п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации РФ от 24 сентября 2013 г. N 842 г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор достойна присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент

заведующий кафедрой нормальной физиологии  
им. Н.Ю. Беленкова государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего  
профессионального образования

«Нижегородская государственная

медицинская академия» Министерства

здравоохранения Российской Федерации

доктор биологических наук, профессор

Мухина Ирина Васильевна

Подпись доктора биологических наук, профессора Мухиной И.В. заверяю

Ученый секретарь государственного бюджетного образовательного учреждения  
высшего профессионального образования «Нижегородская государственная  
медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор биологических наук

Андреева Наталья Николаевна

«28» апреля 2016 г.



Адрес: 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1,  
государственное бюджетное образовательное учреждение высшего  
профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская  
академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.:  
8(831)4390943;

e-mail: [mukhinaiv@mail.ru](mailto:mukhinaiv@mail.ru)