

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Лопатиной Ольги Леонидовны «Окситоцин-опосредованные механизмы регуляции социального поведения и развития тревожных состояний», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность темы диссертации.

Моделирование различных патологий на экспериментальных животных – эффективный способ изучения расстройств физиологических процессов, а также инструмент поиска путей коррекции возникающих негативных изменений. Автор рассматриваемой работы Лопатина Ольга Леонидовна успешно применила данный подход для анализа чрезвычайно актуальной как в фундаментальном, так и практическом отношении проблемы, связанной с молекулярными и клеточными (нейронными) механизмами нарушений социального взаимодействия. Имея глубокую биологическую и эволюционную основу, многочисленные варианты социального («зоосоциального» – в случае животных) взаимодействия вносят огромный вклад в высшую нервную деятельность человека, других млекопитающих, птиц, высокоорганизованных беспозвоночных. При этом можно выявить конкретные мозговые структуры, обеспечивающие запуск полового и родительского поведения, реакций, связанных с агрессией, страхом, сопереживанием, привязанностью и т.д. На молекулярном уровне и при изучении синаптических явлений обнаруживаются медиаторные системы, избирательно связанные с внутривидовым взаимодействием, специфические нейротрансмиттеры, рецепторы, ферменты, транспортные белки и т.д. В этой области особое внимание в последние годы привлекает система окситоцина – соединения, обладающего ярко выраженной периферической и центральной активностью. На примере окситоцина и его производных можно успешно изучать тот важнейший вклад, который вносят регуляторные пептиды в деятельность мозга, эндокринной, иммунной и прочих систем организма. С другой стороны, исследование данной системы позволяет существенно расширить наше понимание генеза нарушений социального поведения, в том числе наиболее известной их группы, объединяемой термином

«расстройства аутистического спектра» (РАС). Стремительный рост встречаемости РАС во всем мире делает задачу их изучения, а также поиска путей направленной фармакологической коррекции не только важной и актуальной, но и совершенно неотложной.

Научная новизна исследования.

В ходе выполнения работы автор успешно применила широкий круг самых современных методических приемов, позволяющих охарактеризовать вклад системы окситоцина в физиологические процессы на уровне поведения (нокаутные мыши), межструктурного (прежде всего, вклад миндалины, гиппокампа) и межклеточного взаимодействия в ЦНС; основное внимание сосредоточено на внутриклеточных регуляторных каскадах, связанных с белками CD38 и CD157.

CD38 – маркер многих вариантов клеточной активации в норме и патологии; обширно представлен на поверхности миеломных клеток, что делает его специфической мишенью для соответствующей иммунотерапии (дарзалекс). В мозге CD38 усиливает выделение окситоцина, активируя (как и в других клетках) синтез циклической АДФ-рибозы – вторичного посредника, участвующего в кальциевой сигнализации. В недавней работе Liu с соавторами (2017) показано, что полиморфизм гена АДФ-рибозил-циклазы CD38 важнее для проявлений альтруистического поведения человека, чем полиморфизм гена собственно рецептора окситоцина (OXTR).

CD157 изучен гораздо хуже (100 публикаций в Pubmed против 6,5 тыс. для CD38), и в представленной работе впервые реализован столь глубокий анализ поведения CD157-нокаутных мышей, а также проведена оценка специфики молекулярной физиологии их нейронов (в рамках системы окситоцина и связанных с ней процессов). Полученные результаты сопоставляются с данными по CD38-нокаутам, поскольку CD157 также активирует синтез цАДФ-рибозы. В итоге Лопатиной О.Л. обнаружен характерный именно для CD157-нокаутных животных рост уровня тревожности, коррелирующий со снижением активности серотонинергической системы в стриатуме и гиппокампе (Kasai, Yoshihara, Lopatina et al., 2017; материал статьи не полностью вошел в текст диссертации; не включены также данные по корректирующему действию селегилина).

Еще одной важнейшей оригинальной составляющей представленной работы

служит анализ связи роста содержания в цитоплазме нейронов цАДФ-рибозы и активации каналов TRPM2 (transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2). Данный канал известен тем, что в иммунных клетках обеспечивает вход кальция под влиянием TNF (Yamamoto et al., 2008). Показано, что TRPM2 отвечает за реакцию на тепловые стимулы, не вызывающие боль (до 38°C; Tan, McNaughton, 2016). Лопатиной Л.О. в результате нескольких серий экспериментов доказана связь роста выделения окситоцина с активацией TRPM2 при гипертермии, после введения липополисахарида, а также при стрессе («социальном» – взаимодействие подчиненных и доминантных мышей, и «психологическом» – помещение в новую среду). На этом основании соискатель сделала интересное и важное заключение о вероятной связи гипертермических состояний и редукции проявлений аутизма у детей (стр. 197, рис. 77).

Теоретическая и практическая значимость.

Полученные автором результаты во многом относятся к сфере одного из наиболее актуальных направлений современной физиологии – нейроиммуноэндокринологии, области, стремящейся к интегрированному рассмотрению взаимосвязанного функционирования трех основных регуляторных систем организма, использующих в качестве сигнальных молекул медиаторы, цитокины и гормоны, соответственно. С этой точки зрения чрезвычайно актуальными оказываются те разделы диссертационной работы, которые посвящены вопросам нейрогенеза и синаптогенеза (гиппокамп, зубчатая извилина, стр. 122-124), а также анализу ситуации экспериментальной нейродегенерации (астроциты и клетки микроглии обонятельных луковиц, стр. 127-128).

Еще один важный момент – очевидный интерес автора к фундаментальным процессам, связанным с активацией систем вторичных посредников. Данные системы, как известно, характеризуются универсальностью и используются в нашем организме клетками практически всех типов для решения самых разных задач. Именно это, как правило, приводит к большому количеству побочных эффектов при попытках фармакологического воздействия на системы цАМФ, цГМФ, ИТФ, ДАГ (в стремлении повлиять на формирование долговременной памяти, замедлить процессы старения и т.п.), а случаи успешного доведения до клинической практики препаратов с таким механизмом действия (скажем,

силденафила) весьма и весьма редки.

Вот почему более явную практическую ориентированность работе могли бы придать серии экспериментов с введением не только окситоцина, но и его модифицированных аналогов. Примером такого проекта может служить исследование Cherepanov et al. (2016), в котором показаны преимущества (более пролонгированное действие, возможности эффективного интраназального введения в весьма низких дозах) конъюгированных с пальмитиновой кислотой аналогов окситоцина.

Одним из важных итогов представленной работы являются рекомендации Лопатиной О.Л. по использованию определения уровня окситоцина в плазме крови в процессе описания конкретных клинических случаев РАС, а также при мониторинге проводимой терапии; по определению полиморфизмов генов CD38, CD157 и TRPM2 в ходе диагностики не только РАС, но и ряда других распространенных нейропатологий (депрессии, повышенной тревожности, паркинсонизма, болезни Альцгеймера).

Обоснованность и достоверность основных положений, результатов и выводов диссертации.

Раздел «Результаты исследований» (глава 3, стр. 83-189) содержит большое количество конкретных экспериментальных данных (в том числе – в графическом виде и в форме микрофотографий), которые объединены соискателем в девять самостоятельных блоков:

- особенности поведенческого статуса у взрослых мышей с делецией (нокаутом) гена CD157/BST1 (использована батарея поведенческих тестов, позволяющая оценить локомоторную активность, тревожность, эмоциональность, депрессивные проявления, социальное взаимодействие – в том числе после введения окситоцина);
- экспрессия CD157 в ряде областей головного мозга (различные зоны коры больших полушарий, гипоталамуса, миндалины); важен и очень интересен факт обнаруженного автором уменьшения размера миндалины у CD157-нокаутных животных (с. 114);
- ферментативная активность CD157 (участие в образовании цАДФ-рибозы из НАД, но не в образовании НААДН из НАДН, что отличает данную белковую

молекулу от CD38);

- активность и экспрессия мРНК АДФ-рибозил-циклазы CD38 у CD157-нокаутных мышей;
- роль CD157 и CD38 в процессах нейрогенеза и синаптогенеза (показаны весьма сходные, однако не полностью совпадающие по паттерну негативные изменения в случае нокаута каждого из генов; рис. 43-44);
- особенности поведенческого развития и ультразвуковой коммуникации у детенышей CD157-нокаутных мышей в возрасте 3, 7, 10 дней, а также у взрослых самцов в ситуации ухаживания; показано «обеднение» паттерна вокализации у нокаутных животных; в частности, контрольные детеныши на 10 день жизни использовали 6 категорий звуков, тогда как мышата без CD157 – только две); при этом заявленный автором подраздел 3.6.5 в тексте диссертации отсутствует (?);
- особенности поведенческого развития и ультразвуковой коммуникации у CD38-нокаутов; показано, что значимое снижение уровня окситоцина в плазме нокаутных животных регистрируется только в возрасте 4 недели (но не ранее);
- изменения (рост) концентрации внутриклеточного кальция в клетках NG108-15 (нейробластома мыши × глиома крысы), экспрессирующих CD38 (но не OXTR) после введения цАДФ-рибозы; эффект ингибировался предварительной аппликацией блокатора TRPM2; в отдельном эксперименте осуществлялась дополнительная трансфекция культуры кДНК OXTR человека;
- влияние гипертермии, воспаления, а также стресса на высвобождение окситоцина из изолированного гипоталамуса мышей (регуляция через CD38 и TRPM2); в ряде экспериментов (в том числе – при изучении взаимодействия подчиненных и доминантных мышей) использовалась микроперфузия головного мозга животных в условиях свободного передвижения (с оценкой концентрации окситоцина в перфузате); показано также значимое увеличение уровня мРНК TRPM2 в гипоталамусе подчиненных мышей.

Все представленные данные хорошо проиллюстрированы (особо отмечу фотографии, сопровождающие иммуногистохимические разделы работы), адекватно статистически обработаны, заключения и выводы достоверны и не вызывают сомнений, несмотря на порой незначительный объем массивов данных

(менее 10 животных).

Структура диссертации и ее завершенность.

Диссертация изложена на 277 страницах машинописного текста, содержит 5 таблиц и 81 рисунок. Введение (актуальность исследования, его цель и задачи, научная новизна, практическая значимость и др.; особое место уделено благодарностям – в том числе японским коллегам «за долговременное научное сотрудничество в области современной нейронауки, бесценный вклад в развитие научного мышления, содействие в проведении экспериментов и подготовке публикаций международного уровня») занимает 15 стр. За ним следуют глава 1 «Обзор литературы» (28 стр.), для которой характерно весьма краткое и конкретное рассмотрение основных вопросов, связанных с молекулярно-физиологическими и нейробиологическими основами функционирования системы окситоцина. Информация предоставлена на самом современном уровне и, несмотря на небольшой объем обзора, общее количество цитируемых работ очень велико (итоговый «Список литературы», представленный на стр. 224-263, включает 423 источника). Глава 2 «Объекты и методы исследования» занимает 22 страницы и состоит из 16 подразделов, где охарактеризованы объекты (экспериментальные животные и культуры клеток), а также то впечатляющее разнообразие методов, которое освоила и использовала автор – от поведенческого тестирования детенышей и половозрелых мышей до ПЦР, иммуногистохимии, микроперфузии и др. Особо описаны приемы статистической обработки результатов, в том числе использование двухфакторного ANOVA (в случае, например, переменных «генотип» × «возраст» или «вводимое вещество» × «тип ультразвуковой вокализации»).

Глава 3 «Результаты исследования» подробно охарактеризована выше.

Глава 4 «Обсуждение полученных результатов» занимает 25 страниц и посвящена обобщению данных. Основные вопросы, попадающие в фокус внимания автора: окситоцин и стресс; окситоцин, аутизм и гипертермия; CD157 и нарушения поведения; CD157 как нейрорегулятор («мультисистемный регулятор»), действующий через систему окситоцина; сопоставление последствий нокаута CD38 и CD157 (в том числе – при оценке поведения детенышей); вклад в эти процессы кальциевой регуляции (участие, прежде всего, TRPM2). В каждом случае автор предлагает обобщающие схемы, которые представляют большую ценность не

только в научном, но и образовательной отношении (их можно с успехом использовать в курсах, связанных с преподаванием нейронаук, что я и планирую делать в МГУ, с разрешения автора).

Разделы «Заключение» (3 стр.) и «Выводы» (7 пунктов) подводят итог и в краткой форме резюмируют как полученные результаты, так и основные итоги их обсуждения.

В целом можно уверенно утверждать, что диссертационное исследование Ольги Леонидовны Лопатиной представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную на очень высоком методическом уровне и позволившую получить большое количество оригинальных научных данных, имеющих важное фундаментальное и практическое значение.

Автореферат диссертации (42 стр. текста, включая 9 рисунков) в полной мере отражает ее основные положения, содержание и выводы.

Работа многократно представлялась на отечественных и международных конференциях (Япония, Германия, Франция, Италия и др.).

Список научных и научно-методических работ Лопатиной О.В. включает более 170 пунктов, в том числе – 40 статей в высокорейтинговых отечественных и зарубежных журналах (24 из них представлены в автореферате в «Списке основных публикаций по теме диссертации»); индекс Хирша по версии РИНЦ – 14.

В качестве замечания можно указать, что, поскольку значительная часть диссертации основана, очевидно, на переводах англоязычных статей, соавтором которых является соискательница, ей не во всех случаях удалось соблюсти смысловое единство текста, весьма велико количество опечаток и стилистических погрешностей; чтение диссертации нередко затрудняется отсутствием специально написанных логических связок между подразделами экспериментальных работ, выполненных в разные годы и для решения разных задач.

Вопросы к соискательнице:

Как оцениваются перспективы прямого клинического применения результатов исследования (возможности интраназального введения окситоцина пациентам)? Ведутся ли работы по изучению свойств аналогов окситоцина?

Можно ли уверенно разделить прямые нейротропные эффекты CD38 / CD157, и то их действие на мозг (поведение), которое опосредуется через другие

системы организма (прежде всего, иммунную и выделение цитокинов)? Известны ли эндокринные эффекты CD38 / CD157?

В последнем предложении вывода 4 автор делает акцент на связи CD157 и болезни Паркинсона, хотя полученные ею данные (стр. 84) не подтверждают такую связь. Как разрешить это противоречие?

Сделанные замечания ни в коей мере не снижают безусловно положительного впечатления от рассматриваемой работы. Можно совершенно однозначно заключить, что представленное О.Л. Лопатиной исследование на тему «Окситоцин-опосредованные механизмы регуляции социального поведения и развития тревожных состояний» по актуальности проблемы, методическому уровню, объему полученных результатов, их новизне, достоверности и научно-практической значимости полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013); автор диссертации – Лопатина Ольга Леонидовна, безусловно заслуживает присвоения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент,
доктор биологических наук,
профессор кафедры физиологии человека и животных
биологического факультета Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, 1, строение 12,
тел. служебный 8-495-9392895
е-мейл: dva-msu@yandex.ru


Дубынин Вячеслав Альбертович

26.01.2018

