

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Семьянова Алексея Васильевича на диссертационную работу Лопатиной Ольги Леонидовны «Окситоцин-опосредованные механизмы регуляции социального поведения и развития тревожных состояний», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология»

Актуальность темы исследования.

Социальное распознавание, восприятие, передача и анализ информации у млекопитающих представляет собой сложный биологический процесс, который требует активации различных молекулярных каскадов. Изменения в молекулярных механизмах, лежащих в основе реализации социального поведения, определяют дефицит социально-когнитивных функций, наблюдаемый при нарушениях аутистического спектра, нейродегенерации и других психических расстройствах. Различные виды поведения, такие как поощрение, социальное исследование, дискриминация социальных стимулов, стрессоустойчивость, осуществляется через действия нейромодуляторов, таких как окситоцин.

Последние десятилетия окситоцин привлекает все большее внимание ученых за счет его способности участвовать в регуляции социального поведения. Было показано, что центральное высвобождение и ауторегуляция окситоцина ассоциированы с CD38/АДФ-рибозилциклазой, бифункциональным рецептором/энзимом, а мыши с дефицитом гена окситоцина или CD38 имеют поведенческие фенотипы с нарушениями в социальной памяти, социальном взаимодействии и в проявлении материнской заботы. CD38 является геном-кандидатом при заболеваниях аутистического спектра, и его поведенческие фенотипы могут быть связаны с расстройствами аутистического спектра. CD38 имеет гомолог CD157/антиген стромальных клеток костного мозга -1 (BST-1), влияние которого на синтез и высвобождение центрального окситоцина, опосредующего социальную когницию, мало изучено. Также не достаточно информации о роли канала TRPM2 при активации рецепторов к окситоцину через цАДФ-рибозу. Все это определяет несомненную актуальность диссертационной работы О.Л. Лопатиной, посвящённой изучению механизмов нейропластичности, ассоциированных с действием социальных факторов, факторов окружающей среды, опосредованных окситоцином, CD38, CD157, TRPM2. Таким образом актуальность исследований, представленных в диссертации О.Л. Лопатиной не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования.

Научная новизна исследования О.Л. Лопатиной состоит в определении новых молекулярных механизмов центрального высвобождения окситоцина, его эффектов на нейропластичность головного мозга в разные периоды онтогенеза в норме и при патологии. Впервые автором показано вовлеченность канала TRPM2 в ауторегуляцию окситоцина, а CD157 и CD38 в процессы нейропластичности головного мозга. Также отмечено, что CD157 может выступать как мультисистемный регулятор. Впервые показано, что TRPM2 обладает прогностическим потенциалом в качестве молекулы-мишени при заболеваниях, ассоциированных с дефицитом социальной когниции и абнормальным эмоциональным состоянием. Таким образом, получены новые доказательства о важной роли окситоцина в реализации социального поведения и новых молекулах-мишенях и генах-кандидатах для диагностики, терапии и прогнозирования развития заболеваний, протекающих с нарушениями социального и эмоционального поведения.

Результаты, полученные автором, являются новыми научными знаниями в области нейронаук.

Обоснованность основных научных положений и выводов

Автором проведено четко спланированное исследование, состоящее из нескольких блоков: *in vivo* - с использованием двух линий нокаутных мышей, мышей дикого типа линии ICR, мышей с локальным нокаутом по CD38 и TRPM2, экспериментальных моделей болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера на мышах; и *in vitro* - клеточные культуры NG108-15 и HEK293. Все эксперименты с использованием лабораторных животных выполнены в соответствии с положениями современной биомедицинской этики.

Исследование структурировано логично: каждый последующий эксперимент определен предыдущим, организуя цепь логических рассуждений, выдвигаемых гипотез и обосновывая полученные результаты и выводы.

В работе использованы современные экспериментальные подходы: генетические, молекулярные и др. Полученные результаты проанализированы с помощью релевантных статистических методов.

Положения, выносимые на защиту, и выводы соответствуют поставленным цели и задачам.

Основные научные результаты опубликованы в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК.

Научно-теоретическая и практическая значимость работы

Исследование О.Л. Лопатиной вносит весомый вклад в понимание молекулярных механизмов синтеза и высвобождения окситоцина в процессе реализации социального поведения и ответа на стресс, механизмов развития аутистически-подобных состояний. Автором показана значимость CD38, CD157, TRPM2 в каскадах секреции и процессах ауторегуляции окситоцина. В процессе выполнения исследования определены молекулы-мишени для фармакологической модуляции нарушенного социального и эмоционального поведения. Полученные результаты являются важным элементом для понимания комплексных функций головного мозга и сложных форм поведения, как в фундаментальной науке, так и неврологической и психиатрической практике.

Содержание диссертации, ее завершенность

Диссертация оформлена по традиционной схеме и включает в себя: введение, 4 главы, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы. Диссертация изложена на 277 страницах, содержит 5 таблиц, 81 рисунок, 13 приложений. Список литературы охватывает как отечественные, так и зарубежные источники, в целом 423 источника.

Во введении ярко описано актуальность темы исследования, научная новизна, четко сформулированы цель и задачи исследования.

В обзоре литературы описаны синтез и секреции окситоцина, а также его участие в различных видах социального поведения. Представлена информация о вовлеченности окситоциновых рецепторов в молекулярные каскады. Подробно и убедительно представлены CD38, CD157, TRPM2 и их известные функции в центральной нервной системе.

В главе «Объекты и методы исследования» достаточно подробно описаны экспериментальные группы, используемые методики, указаны примененные реактивы.

В главе «Результаты исследования» рассмотрены полученные экспериментальные данные и их визуализация в виде схем и таблиц, что позволит полностью погрузиться в анализ исследования.

Обсуждение результатов проведено корректно. Все сделанные выводы обоснованы и аргументированы экспериментальными данными.

Основные положения и результаты диссертационного исследования были неоднократно доложены на научно-практических конференциях.

Автореферат

Основные положения автореферата полностью соответствуют разделам и содержанию диссертационной работы. Автореферат полноценно отражает методологический и экспериментальный материал, иллюстрирован рисунками.

Замечания и вопросы

Замечания:

1. Работа в целом написана очень хорошо и четко. Но учитывая ее большой объем, в ней все же встречаются стилистические погрешности. Например, на странице 9 автор пишет «По данным Всемирной организации аутизма, в 2008 году 1 случай аутизма приходился на 150 детей, а в 2014 году - 65-67 случаев на 10000 новорожденных.» Для удобства прочтения имеет смысл привести данные к единому формату: в 2008 году 66 случаев, в 2014 году 65-67 случаев на 10000 новорожденных.

2. В работе используются сокращения наряду с полным написанием термина: например, стр 11 «... окситоцин-индуцированного высвобождения ОХТ ...» и далее по тексту. Это путает читателя.

3. Иногда текст написан слишком общо: «Получены принципиально новые данные о влиянии окситоцина на пластичность лимбико-гипоталамо-гипофизарной системы на разных этапах развития головного мозга в норме и при патологии.» Какие конкретно новые данные?

4. У ряда рисунков указан только заголовок, но отсутствует подпись (рис.3 и др). Схемы воспринимаются легче, если у них есть описание не в основном тексте, но и в подписи к рисунку.

5. В тексте есть ряд мелких опечаток и грамматических неточностей:

стр. 31 «Активация протеина Gq ... способствует выходу кальция через VGCCs» - должно быть «входу»

6. Стр. 57 «Мыши, дефицитные по Cd157/Bst1 (Cd157-/-).», стр. 124 «нокаут по гену Cd38, так же как и дефицит Cd157» и далее по тексту. В американском английском, слово deficient означает лишенный чего-либо (lacking). В русском языке, дефицит означает недостаточность чего-либо. Таким образом, нокаутных мышей правильнее называть «мышами, лишенными гена». Мыши, дефицитные по тому или иному гену – нокдаунные.

7. Стр. 63 «помещали ... наивную самку» naïve - переводится с французского как "не имеющий опыта". В русском языке, наивность – это синоним простодушия, доверчивости. В данном контексте правильнее было бы использовать «самку, ранее не использованную в данном эксперименте»

8. Какие-то сокращения приводятся без расшифровки (например, ОТ-ПЦР).

9. Стр. 219 «мобилизация Ca²⁺ через каналы TRPM2.» В данном контексте, правильнее писать «вход Ca²⁺ через каналы TRPM2.

Вопросы:

1. Автор указывает, что окситоцин высвобождается аксонами и дендритами. Как происходит это высвобождение? Оно везикулярное или неvesикулярное? Если это

везикулярное высвобождение, то видны ли в дендритах соответствующие везикулы на электронной микроскопии? Как окситоцин загружается в везикулы? Если это невезикулярное высвобождение, то какой у него механизм? Что является Ca^{2+} сенсором?

2. Автор подробно описывает методы создания нокаутных мышей в разделе Методы. Принимала ли автор участие в создании этих линий? Если нет, то зачем даются подробности их создания в методической секции? Если да, то почему ее нет в соавторах оригинальных статей где описаны эти линии?

3. Автор утверждает, что Cd38 и Cd157 играют роль в развитии головного мозга. При этом в работе использовались конститутивные нокауты, в которых помимо нарушений развития могут запускаться компенсаторные механизмы. А это значит, что автор могла изучать не роль Cd38 и Cd157 в использованных тестах, а роль всех нарушений развития и компенсаторных изменений, связанных с их нокаутом. Существуют ли кондиционные нокауты данных белков? Как они отличаются от конститутивных нокаутов?

4. Стр. 60 «Мышей использовали через 2 недели после выздоровления и эффективного заражения лентивирусами.» Как оценивалась эффективность заражения лентивирусами? Насколько большой была область трансдукции при внутрижелудочковом введении?

5. Раздел 3.5.3 заголовок «в клетках астроглиальной природы» О каких конкретно клетках идет речь? В разделе написано про микроглию, которая не имеет астроглиальной природы.

6. Стр. 128 «Увеличение экспрессии CD38 в S100beta+ астроцитах может быть связано с мобилизацией внутриклеточного кальция, астроцитозом, миграцией клеток.» А выделяют ли астроциты окситоцин и какое значение в этом контексте может иметь увеличение экспрессии CD38 и CD157 в этих клетках при экспериментальной нейродегенерации?

7. Что означает на рисунке 81 «экзогенный ОХТ»? Почему через него проходит стрелка от состояния животного? «Экзогенный» означает введенный экспериментатором (и судя по методической секции, это так и было). В 7 выводе работы также фигурирует термин «Секреция экзогенного ОХТ». Что это значит?

8. Из заключений автора следует, что цАДФ рибоза негативно регулирует ОХТ рецепторы, но при этом запускает повышение Ca^{2+} в клетке и высвобождение ОХТ. Какая физиологическая значимость этих взаимокompенсирующих процессов?

9. Для подтверждения 5-го вывода нужно проверить как болезнь Альцгеймера развивается на CD157^{-/-} и CD38^{-/-}. Проводились ли данные эксперименты?

Данные замечания и вопросы ни к коей мере не умаляют высокого уровня представленной диссертации.

Заключение.

Диссертационное исследование Лопатиной Ольги Леонидовны «Окситоцин-опосредованные механизмы регуляции социального поведения и развития тревожных состояний» выполнено на высоком научно-экспериментальном уровне и представляет собой законченную научно-квалификационную работу, удовлетворяющую всем требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор – Лопатина Ольга Леонидовна - заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология».

Официальный оппонент,
заведующий отделом молекулярной нейробиологии,
заведующий лабораторией внесинаптической передачи
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук,
доктор биологических наук

Алексей Васильевич Семьянов

«02» февраля 2018г.

Личную подпись
УДОСТОВЕРЯЮ.
ЗАВ. КАНЦЕЛЯРИЕЙ
"02" февр. 2018



Семьянов А. В.

Семьянов Алексей Васильевич, доктор биологических наук, заведующий отделом молекулярной нейробиологии, заведующий лабораторией внесинаптической передачи, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва 117997.
Тел: +7 920 049 35 29, эл. почта: semyanov@ibch.ru