

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт физиологии
им. И.П. Павлова
Российской академии наук
(ИФ РАН)

199034, Санкт-Петербург, Васильевский остров,
набережная Макарова, д. 6
188680, Ленинградская обл., Всеволожский район;
Колтушское сельское поселение,
село Павлово, ул. Быкова, д. 36
Телефоны: (812) 328-0701, 328-1301
(813) 70-72-501.
Факсы: (812) 328-0501, (813) 7072-485.
E-mail: Pavlov.institute@infran.ru
Сайт: <http://www.infran.ru>
ОКПО 02698565 ОГРН 1037800014823
ИНН 7801022898 / КПП 780101001

От «27» 02 2024 г. № 2115/001-96

На № _____ от «__» _____ 2024 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

директор ФГБУН

Института физиологии

им. И. П. Павлова РАН

д.б.н. Н.А. Дюжикова



«27» февраля 2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Решетникова Василия Владимировича на тему «Изменение транскриптома и паттерна распределения эпигенетической модификации H3K4me3 под действием раннего постнатального стресса в префронтальной коре у самцов мышей», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика.

Актуальность

Пренатальный и постнатальный период являются важными периодами в жизни каждого индивида. Во этот период активно развиваются различные структуры мозга, формируется их нейроэндокринная регуляция. А поддержание баланса гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы обеспечивает правильное завершение ЦНС. Стрессорные воздействия в этот период способны привести к нарушению этого баланса, что в дальнейшем может повышать риск нарушений в поведении у животных и

психопатологий у человека. К таким последствиям относят: снижение когнитивных способностей, расстройства настроения, повышенную тревожность и стресс-реактивность, реализующиеся через работу префронтальной коры, передней поясной извилины и гиппокамп. Известно, что отставленные во времени физиологические эффекты связаны с изменением эпигенетических модификаций хроматина и дифференциальной экспрессии генов. Однако, несмотря на интенсивное изучение эффектов раннего постнатального стресса, молекулярные механизмы, приводящие к отставленным поведенческим нарушениям, все еще остаются мало исследованными. Поэтому выяснение молекулярных механизмов отсроченного влияния неблагоприятных событий в ранний постнатальный период является приоритетной задачей на сегодняшний день. Исследования на животных моделях стресса в раннем возрасте позволяют выяснить молекулярные механизмы, лежащие в основе отставленных эффектов такого стресса, и разработать адекватные методы коррекции нарушений. Актуальность исследования В.В. Решетникова не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений и выводов

Целью диссертационной работы В.В. Решетникова было выявить отставленные эффекты раннего постнатального стресса на поведение взрослых мышей и определить молекулярные последствия данного стресса для префронтальной коры головного мозга на уровне экспрессии генов и распределения гистоновой модификации H3K4me3 как в нормальных условиях развития, так и после предъявления хронического стресса социальных поражений во взрослом возрасте.

В ходе выполнения работы автором были сформулированы и успешно решены следующие научные задачи:

1. Оценить влияние раннего постнатального стресса на индивидуальное и социальное поведение, процессы обучения и памяти у взрослых животных.

2. Определить отсроченное влияние постнатального стресса на транскриптом префронтальной коры головного мозга взрослых самцов мышей.
3. Определить отсроченные эффекты раннего постнатального стресса на полногеномное распределение модификации хроматина H3K4me3 (ChIP-seq) в префронтальной коре головного мозга взрослых самцов мышей.
4. Оценить влияние раннего постнатального стресса на чувствительность к социальному стрессу во взрослом возрасте по поведенческим показателям, изменениям в транскриптом и распределении гистоновой модификации H3K4me3 в префронтальной коре головного мозга взрослых самцов мышей.

Для решения поставленных задач автор разработал адекватный дизайн исследования, использовал современные методы (длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период, стандартные поведенческие тесты, ИФА, хроматография, RNA-seq, ПЦР, ChIP-seq, биоинформатический и статистический анализ).

На защиту вынесено 2 положения. Первое утверждает, что ранний постнатальный стресс негативно влияет на активность глутаматной системы в префронтальной коре головного мозга взрослых самцов мышей C57BL/6 и связанных с ней процессов обучения и памяти – снижает экспрессию генов факторов синаптической пластичности *Pclo* и *Bdnf* и генов *Grin2a* и *Grin2b* ионотропных NMDA рецепторов, а также повышает экспрессию генов белков *Mal*, *Mbp* и *Ugt8a*, участвующих в процессах миелинизации. Второе положение говорит о том, что сочетание стресса в ранний постнатальный период и социального стресса во взрослом возрасте негативно влияет на активность ключевых генов глутаматной системы *Homer1* и *Sorcs3* в префронтальной коре головного мозга у самцов мышей, а также повышает уровень экспрессии генов *Ciart* и *Dbp*, что связано с нарушениями циркадных ритмов.

Сформулировано 4 вывода, которые обоснованы изложенными в работе результатами исследования.

Научная новизна исследования

Решетниковым В.В. получены новые знания о влиянии раннего постнатального стресса на транскриптом и профиль гистоновой модификации H3K4me3 в префронтальной коре головного мозга взрослых самцов мышей. Были найдены значительные изменения в уровне транскрипции генов и лишь небольшие изменения в уровне H3K4me3 в отдельных районах генома, которые не связаны с выявленными изменениями в экспрессии генов.

Впервые исследовано влияние раннего постнатального стресса на чувствительность к хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте на поведенческом уровне, на уровне экспрессии генов (транскриптом) и распределения гистоновой модификации H3K4me3 в префронтальной коре головного мозга. Сочетание двух стрессов усиливает изменения в экспрессии ряда генов, связанных с циркадными ритмами, а также изменяет паттерн распределения H3K4me3 в их промоторах.

Теоретическая и научно-практическая ценность исследования

Использованный в диссертационной работе Решетниковым В.В. подход позволяет выявить новые гены-мишени и генные пути, изменяющиеся под действием раннего постнатального стресса, хронического стресса социальных поражений и их комбинации, что в сочетании с анализом их регуляторных районов дает более целостное представление об отсроченных эффектах раннего постнатального стресса. Эти результаты вносят вклад в понимание фундаментальных основ молекулярных механизмов стресса в ранний период жизни и его роли в формировании последующей гиперчувствительности к стрессу во взрослом возрасте. Кроме того, результаты могут быть использованы для выбора и разработки терапевтических препаратов, корректирующих отставленные последствия стресса в раннем возрасте.

Апробация работы и публикации

Основные результаты диссертации были представлены на 6 российских и международных конференциях. По материалам работы опубликовано 12 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, и в изданиях, входящих в базы Scopus и Web of Science.

Структура диссертационной работы

Диссертация В.В. Решетникова написана по стандартному плану и изложена на 185 страницах машинописного текста; включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, список использованной литературы и приложения. Список обсуждаемой литературы является обширным, содержит 384 источников, 1 – на русском, 383 на английском языке. Диссертация хорошо проиллюстрирована 26 рисунками и 10 таблицами, 4 из которых находятся в разделе «Приложение».

Во введении автор, на основании анализа исследований о влиянии стрессорных воздействий в ранний постнатальный период на дальнейшее развитие и механизмах таких отсроченных эффектов, формулирует цели и задачи проводимого исследования.

В обзоре литературы автор описывает особенности постнатального развития, рассказывает о последствиях стресса в этот период, о моделях раннего постнатального стресса на животных, стресс-реактивности и моделях хронического стресса на взрослых животных. Также автор приводит данные о возможных молекулярных механизмах стресса, среди которых метилирование ДНК, модификации гистонов, некодирующие РНК. Представляет литературные данные о молекулярных изменениях, вызванных постнатальным стрессом: эпигенетических модификациях и в генной экспрессии, влиянии на миелинизацию и работу глутамат- и ГАМК-эргических систем мозга. Содержание обзора литературы позволяет говорить о глубоком знании автором состояния исследований в этой области.

Раздел «Материалы и методы» свидетельствует о проведении работы на высоком методическом уровне. В ходе выполнения диссертационной работы автором использованы поведенческие, современные молекулярно-биологические и биоинформатические методы. Все методики и процедуры описаны четко и ясно, могут быть воспроизведены.

В разделе «Результаты» представлено подробное изложение собственных результатов. Сначала приведены результаты по влиянию длительного отделения от матерей в ранний постнатальный период на базальную активность ГГНС, на поведение (двигательную активность и память), генную экспрессию и профиль H3K4me3. У самцов мышей различных возрастов не было обнаружено значимых различий между контрольными и опытными группами по базальной активности гипоталамо-гипофизарная-надпочечниковой системы. Далее представлены результаты поведенческих тестов (лабиринт Морриса, приподнятый крестообразный лабиринт, тест социальных взаимодействий, тест Порсолта): у взрослых животных снижается двигательная и исследовательская активность, нарушается пространственная память и распознавание новых объектов, но не изменяются параметры тревожности, социального поведения и скорость обучения. Затем следуют результаты анализа экспрессии генов. На основании RNA-seq обнаружены изменения в экспрессии 648 генов, среди которых были гены, связанные с нейрональной пластичностью (глутамат- и ГАМК-эргических систем, гены, связанные с ростом аксонов и клеточного распознавания и межклеточным сигналингом и др.), гены рибосомальных белков (что, по мнению автора, свидетельствует об интенсификации процессов трансляции) и гены, связанные с процессами миелинизации. Анализ профиля активного хроматина в префронтальной коре взрослых животных с историей раннего постнатального стрессирования выявил изменения в 45 пиках H3K4me3, относящихся к 70-ти генам (среди которых гены глутаматной системы, регуляции роста отростков и миграции нейронов, и др.). Проведенная количественная ПЦР (11 генов) подтвердила связь между

увеличением плотности распределения H3K4me3 в их промоторных регионах генов с повышением уровня экспрессии только для трех генов в группе постнатального стрессирования. Сопоставление 649 дифференциально экспрессирующихся генов, полученных на основе анализа транскриптома, и 70 генов с измененными профилями H3K4me3 показало, что только 4 гена пересекаются между двумя этими списками генов. Далее приведены данные о влиянии длительного отдаления от матерей в ранний постнатальный период на чувствительность к хроническому стрессу социальных поражений у взрослых самцов. Обнаружено, что стресс в раннем возрасте модулирует эффекты последующего хронического стресса социальных поражений во взрослом возрасте. У взрослых самцов мышей с историей стресса в ранний постнатальный период в ответ на дополнительный стресс наблюдается более выраженное повышение уровня кортикостерона и повышение уровня тревожности, чем у животных только с хроническим стрессом, а также специфические изменения в экспрессии генов, в альтернативном сплайсинге и в распределении модификации хроматина H3K4me3 в префронтальной коре. Наиболее интересные результаты, по мнению автора, связаны с геном *Homer1*, участвующим в регуляции глутамат-зависимой синаптической пластичности.

В разделе «Обсуждение» автор проанализировал полученные результаты и сопоставил их с литературными данными.

В разделе «Выводы» представлены 4 конкретные вывода, которые четко сформулированы, основаны на полученных в ходе работы результатах и полностью соответствуют поставленным целям и задачам исследования.

Вопросы и замечания

1. На рисунке 23 продемонстрирована корреляция между плотностью широких пиков H3K4me3 и экспрессией клеточно-специфических генов. Максимальное значение корреляции получено для генов, связанных с эндотелиальными и микроглиальными клетками. На что, по мнению автора, это может указывать?

2. К сожалению, в списке литературы приведена лишь одна русскоязычная работа.

3. В тексте работы встречаются опечатки и небольшие оформительские недостатки, что ни в коей мере не снижает общего высокого мнения о диссертационной работе, которая содержит оригинальный добротный материал и в целом хорошо оформлена.

Заключение

Диссертационная работа Решетникова Василия Владимировича «Изменение транскриптома и паттерна распределения эпигенетической модификации H3K4me3 под действием раннего постнатального стресса в префронтальной коре у самцов мышей», научный руководитель – кандидат биологических наук Н.П. Бондарь, является целостным, законченным научно-квалификационным трудом, выполненным автором самостоятельно. Работа написана единолично и свидетельствует о высокой профессиональной подготовленности автора и содержит новые научные результаты и положения, касающиеся молекулярной природы отставленных эффектов раннего постнатального стресса.

По актуальности темы, методическому и научному уровню, новизне и научно-практической значимости полученных результатов, обоснованности научных положений и выводов диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, (с изменениями от 18.03.2023 г., 25.01.2024г.), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Решетников Василий Владимирович заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика.

Работа обсуждена, отзыв заслушан и одобрен на заседании лаборатории генетики высшей нервной деятельности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (протокол № 2 от «05» февраля 2024 г.).

И.о. заведующего лаборатории генетики высшей нервной деятельности, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук,
кандидат биологических наук



Зачепило Т.Г.

Личную подпись д.б.н., Зачепило Т.Г. заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук
к.б.н.



Петропавловская Е.А.

Дата: « 27 » февраля 2024 г.

Сведения о ведущей организации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук
199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.б.
тел. (812) 328-11-01,
факс (812) 328-05-01,
e-mail: Pavlov.institute@infran.ru
Сайт: <https://www.infran.ru/>