

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Пчелиной Софьи Николаевны на диссертационную работу Решетникова Василия Владимировича «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 темы исследования

Диссертационное исследование Решетникова Василия Владимировича посвящено выявлению молекулярных механизмов отставленных эффектов влияния постнатального стресса у мышей в том числе в комбинации с социальным стрессом взрослого возраста. В настоящее время широко обсуждается влияние стресса, перенесенного человеком в раннем возрасте, как на социальную адаптацию во взрослом возрасте, а также на развитие депрессий и психических расстройств. Для выявления молекулярных механизмов данного процесса используются ряд животных моделей, широко распространен подход генерации постнатального стресса у грызунов (мыши, крысы) с оценкой как поведенческих отставленных эффектов, так и биохимических изменений в тканях мозга. С развитием омиксных молекулярно-генетических технологий появляются исследования по оценке транскриптомных и протеомных маркеров стресса у модельных животных. Предполагается, что ведущая роль в генерации таких отставленных эффектов принадлежит эпигенетической тканеспецифичной регуляции работы генов в клетках мозга. Однако, исследования, включающие комплексный подход, использующий наряду с оценкой транскриптома клеток мозга исследования геномного паттерна эпигенетических изменений остаются единичными. В данной связи настоящее диссертационное исследование Решетникова В.В. сочетающее оценку экспрессии генов (транскриптома) в префронтальной коре головного мозга мышей, подвергшихся постнатальному стрессу, с оценкой распределения метилирования лизина 4 гистона H3 (H3K4me3) является актуальным.

Научная новизна исследования

Новизна исследования в первую очередь основана на комплексном подходе к оценке геномных изменений на уровне транскриптома, а также метилирования гистона H3, не только у мышей взрослого возраста (постнатальные дни 90-110), подвергшихся раннему постнатальному стрессу, но также и в сочетании постнатального стресса с хроническим стрессом социального поражения во взрослом возрасте. Впервые показано, что сочетание постнатального стресса со стрессом социальных поражений характеризуется изменением экспрессии генов, связанных с циркадными ритмами, и меняет распределения метилированного гистона H3 в их промоторах. Впервые показано, что данная группа экспериментальных животных характеризуется также снижением экспрессии одной из изоформ гена *Homer1* (*Homer1a*), которая может рассматриваться как ген раннего ответа адаптации к стрессу на молекулярном уровне.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования

Результаты диссертационного исследования Решетникова В.В. существенно расширяют представления о молекулярных механизмах влияния раннего постнатального стресса на отдаленные последствия, в том числе, при получении социального стресса во взрослом возрасте. Используемые подходы позволили выявить новые гены-мишени и генные пути, изменяющиеся под действием раннего постнатального стресса, хронического стресса социальных поражений и их комбинации. Полученные результаты могут быть использованы для выбора мишеней терапевтических препаратов, корректирующих отставленные последствия стресса в раннем возрасте.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Диссертационная работа Решетникова В.В. выполнена на высоком методическом уровне. Высокая степень достоверности и обоснованности выводов, а также основных результатов диссертационной работы обусловлена разнообразием и адекватностью использованных подходов. Так, изменения уровня экспрессии генов, полученных при транскриптомном анализе валидированы на расширенных группах экспериментальных животных методом ПЦР в режиме реального времени. Так же, уровень мРНК генов, локализованных в сайтах ремоделированного хроматина с модификацией гистона H3 (H3K4me3) оценены с использованием метода ПЦР в режиме реального времени. Используемые подгруппы животных являлись

достаточными. Полученные выводы полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Решетникова В.В. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и заключения. Работа изложена на 185 страницах, содержит 26 рисунков, 6 таблиц и 4 приложения.

Во введении автором обозначены актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Сформулированные автором задачи исследования адекватны и соответствуют поставленной цели.

Обзор литературы написан ясным научным языком и легко читается. Подробно описаны гипотезы формирования постнатального стресса у грызунов, а также общепринятые методы формирования постнатального стресса, включающие длительное отлучение от матери, ограничение материала для гнездования, индицирование воспаления путем введения липополисахаридов. Описаны также структурно-функциональные изменения головного мозга как у людей, так и у грызунов при наличии стресса. Обсуждается, что отдаленные последствия стресса могут быть опосредованы и «закреплены» через эпигенетические изменения. Таким образом, обзор литературы логично приводит к формулировке цели исследования, а именно «Целью данной работы 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». Единственно, кажется, что при формулировке цели слово «выявить» логичнее заменить на «исследовать», поскольку цель формулируется до проведения исследования.

В главе «Материалы и методы исследования» подробно описаны все экспериментальные методы исследования. В работе использованы самый современный широкий арсенал методов исследования, включая геномные методы- оценка экспрессии генов (RNA-seq), включающий подготовку библиотек кДНК и секвенирование с использованием массового параллельного секвенирования, а также анализ модификации гистона H3 (H3K4me3) с помощью метода ChIP-seq. Результаты валидированы с использованием метода ПЦР в режиме реального времени, приведены

структуры олигонуклеотидов целевых и референсных генов. Статистическая обработка данных замечаний не вызывает.

В главе «Результаты» приводится подробное описание полученных результатов. Особенно хочется отметить масштаб выполненных исследований. В работу было включено 6 экспериментов. В группе экспериментов 1-3 автор оценивал эффекты раннего постнатального стресса, вызванного ежедневным опытом отделения от матери в течение 2-х недель на активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. В эксперименте 3 было оценено влияние раннего стресса на экспрессию гена *Crh* в гипоталамусе, уровень кортикостерона в сыворотке крови, а также ряд параметров обучения (тест распознавания нового объекта, водного лабиринта Морриса). В экспериментах 4 и 5 наряду с экспериментами по оценке поведения был проведен анализ транскриптома RNA-seq и модификации хроматина (ChIP-seq). В шестом эксперименте все указанные параметры были оценены у взрослых животных при сочетании постнатального стресса и социального стресса во взрослом возрасте. Все эксперименты проведены на самцах инбредной линии мышей C57BL/6.

Хочется также подчеркнуть тщательный анализ эпигенетического влияния. Автор не ограничивается списком геномных локусов с измененной структурой хроматина, а проводит в данных локусах оценку экспрессии генов методом ПЦР в режиме реального времени. Так в работе показано, что комбинация постнатального стресса и социального стресса взрослого возраста привела к изменению экспрессии генов глутаматной системы *Homer1* и *Sorcs3* и генов циркадных ритмов *Ciart* и *Dbp*. У последнего также был изменен профиль H3K4me3. Учитывая обсуждение о выраженной представленности изоформ белков в мозге и роли представленности данных изоформ в работе мозга наиболее интересным результатом представляется продемонстрированное снижение изоформы *Homer1a*. Автор обсуждает, что, по данным литературы, введение только короткой изоформы *Homer1a* нокаутным по гену *Homer1* мышам приводит к снижению депрессивно-подобного поведения. В работе подробно обсуждается механизм влияния соотношения изоформ *Homer1a* на регуляцию глутаматергической нейротрансмиссии в сторону снижения синаптической передачи, а также его роль как нейропротектора.

В заключении автор подводит итог всех исследований и резюмирует ключевые положения диссертационной работы.

Выводы диссертационного исследования соответствуют поставленным целям и задачам.

Автореферат отражает основные результаты выполненной диссертационной работы.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Результаты диссертационного исследования прекрасно опубликованы. По результатам диссертационного исследования опубликовано 11 статей в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и/или Web of Science. При этом в семи публикациях автор диссертации является первым автором публикации. Промежуточные результаты доложены на зарубежных и отечественных конференциях.

Вопросы и замечания

1. Основным замечанием по работе является отсутствие группы сравнения стрессом в раннем возрасте (длительное отделение (ДО) в эксперименте 6 (эксперимент по оценке транскриптомных маркеров (RNA-seq) в группе животных с двойным стрессом в раннем возрасте (длительное отделение (ДО)) и стрессом социального поражения (СС) во взрослом возрасте. Подпись к рисунку 18 (стр 97) указывает, что на рисунке приведены дифференциально экспрессирующиеся гены «вызванные стрессом в раннем возрасте (ДО), стрессом социального поражения (СС) и их комбинацией (ДО+СС)». Но при этом, данные по группе ДО не приведены. Как можно понять из схемы эксперимента 6 (стр. 53) данная группа животных в эксперимент включена не была. Однако, данная группа животных (ДО) присутствовала в эксперименте 4, и, при анализе транскриптома коры головного мозга было выявлено 648 дифференциально экспрессирующихся генов. Как объяснить, что в аналогичном эксперименте, но в комбинации с СС (ДО+СС) их было выявлено только 20?

2. В эксперимента 4 было выявлено 648 дифференциально экспрессирующихся генов. На каком основании были отобраны гены в количестве 17 для верификации уровня их мРНК методом ПЦР в режиме реального времени? Ни ранжированный список генов, ни данных в виде вулcano-плот в работе не приведены. Были ли это гены, показавшие отличия от контроля с наибольшей статистической значимостью? Что означает фраза «Для подтверждения различий в экспрессии некоторых ключевых генов на расширенных выборках животных»? Какое количество животных было включено в данном случае в эксперимент?

3. Крайне интересными представляются данные о снижении уровня изоформы *Homer1a* в группе животных с ранним постнатальным стрессом в сочетании со стрессом социальных поражений во взрослом возрасте. На рисунке 26 приведена предполагаемая схема роли данной изоформы белка в регуляции синаптической передачи. Почему данное наблюдение о снижении изоформы *Homer1a* не вынесено в положения и выводы? Также было бы крайне интересно узнать в каком возрасте появляется снижение данной изоформы. Автор отмечает, что в группе животных с ДО также наблюдалось снижение экспрессии гена *Homer1* в префронтальной коре. Однако, распределение изоформ данного гена в этой группе животных в работе не приводится. Не представляется ли автору важным продемонстрировать, что снижение данной изоформы белка предшествовало СС, что и в какой-то мере определило более выраженный ответ на него?

Данные замечания в целом не противоречат положительной оценке работы и не снижают её научно-практической ценности.

Заключение

Диссертационная работа работу Решетникова Василия Владимировича «Изменение транскриптома и паттерна распределения эпигенетической модификации $H3K4me3$ под действием раннего постнатального стресса в префронтальной коре у самцов мышей» по специальности 1.5.7. – генетика, является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, имеющей важное значение для биологической науки в целом, а именно, выявление молекулярных механизмов влияния раннего постнатального стресса на поведение и адаптацию к социальному стрессу во взрослом возрасте. Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9-14, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09. 2013 г. № 842 (в редакции с изменениями и дополнениями от 30 июля 2014 г., 21 апреля, 2 августа 2016 г., 29 мая, 28 августа 2017 г., 1 октября 2018 г., 20 марта, 11 сентября 2021 г.), а ее автор – Решетников Василий Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика.

Официальный оппонент:

Руководитель отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий НИЦ Федерального государственного бюджетного

образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, доктор биологических наук (специальность 03.02.07 – генетика).



Пчелина Софья Николаевна

« 04 » 03 2024 г.

Подпись Пчелиной Софьи Николаевны заверяю: _____

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор Беженарь Виталий Федорович





Беженарь Виталий Федорович

« 04 » 03 2024 г.