

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук  
Тихоновой Марии Александровны  
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 диссертационной работы.**

Диссертационное исследование В.В. Решетникова посвящено изучению отставленных эффектов раннего постнатального стресса на поведение взрослых мышей и определению молекулярных последствий данного стресса на уровне транскрипции генов и распределения модификации хроматина H3K4me3 в префронтальной коре головного мозга. Актуальность проведенного исследования не вызывает сомнения и продиктована важностью перинатального периода для всей дальнейшей жизни индивида. Стрессорные воздействия в раннем постнатальном периоде способны нарушить нейропластичность развивающегося мозга, и их неблагоприятные последствия (снижение когнитивных способностей, повышенная стресс-реактивность, расстройства настроения, повышенная тревожность) могут наблюдаться на протяжении всей жизни индивида. Предполагается, что отсроченные эффекты раннего стресса обусловлены эпигенетическими изменениями регуляции экспрессии генов в головном мозге. Однако, несмотря на интенсивное изучение эффектов раннего постнатального стресса, вопрос о молекулярных механизмах, приводящих к поведенческим нарушениям, остается не до конца исследованным. В этой связи, диссертационная работа В.В. Решетникова, несомненно, актуальна и практически значима.

**Новизна исследования.** Диссертационное исследование Решетникова В.В. отличается научной новизной, открывая ранее неизвестные аспекты регуляции отставленных эффектов раннего стресса через эпигенетические механизмы. Соискателем получены новые оригинальные данные при изучении отставленных эффектов стресса в раннем возрасте на транскриптом префронтальной коры головного мозга и уровне триметилирования гистона H3 по 4му лизину (H3K4me3) в этой мозговой структуре у взрослых самцов мышей, что вносит существенный вклад в понимание данной проблемы. Проведено комплексное исследование эффектов раннего постнатального стресса на поведенческом уровне и установлено, что животные, подверженные раннему постнатальному стрессу, более чувствительны к хроническому стрессу социальных поражений. Впервые оценили влияние раннего постнатального стресса на чувствительность к хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте на уровне экспрессии генов

(транскриптом) и распределения гистоновой модификации H3K4me3 в префронтальной коре головного мозга. Установлено, что сочетание двух стрессов усиливает изменения в экспрессии ряда генов, связанных с циркадными ритмами (*Ciart*, *Dbp*), и гена скаффолда (*Homer1*), а также изменяет паттерн распределения H3K4me3 в промоторах генов, связанных с циркадными ритмами (*Per1*, *Dbp*, *Nr1d1*).

**Содержание и оформление диссертации.** Диссертационная работа В.В. Решетникова построена по традиционному плану, состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка литературы и 4 приложений с техническими характеристиками RNA-seq библиотек. Работа изложена на 185 страницах, содержит 26 рисунков, 6 таблиц и 4 приложения.

Введение включает исчерпывающие сведения актуальности выполняемой работы, показана степень научной разработанности проблемы, определена цель и сформулированы логически выстроенные задачи исследования, определена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы в полной мере суммированы данные литературы по теме исследования. Обзор литературы представляет собой последовательно и четко изложенный раздел диссертации, в котором представлены современные данные о молекулярных механизмах ответа на стресс, особенностях постнатального периода развития и раннего постнатального стресса у людей, моделях раннего постнатального стресса и хронического стресса во взрослом возрасте на животных, подробно описаны морфологические и функциональные изменения в головном мозге под действием раннего постнатального стресса и влияние последнего на стресс-реактивность, проанализированы молекулярные изменения, вызванные ранним постнатальным стрессом, и возможные эпигенетические механизмы эффектов. Этот раздел читается с большим интересом. Представленный обзор свидетельствует о хорошем знании автором современных данных по исследуемой проблеме и логически подводит к необходимости проведения собственного диссертационного исследования.

Во второй главе автором представлены материалы и методы. Работа выполнена на лабораторных мышах инбредной линии C57BL/6. Для моделирования раннего постнатального стресса соискатель использовал модель длительного отделения (на 3 часа в день) детенышей от матерей со 2 по 14 день постнатального развития. Для получения мышей с опытом социальных поражений (модель хронического стресса во взрослом возрасте) использовали модель сенсорного контакта. В качестве методов лабораторного исследования автором использованы: батарея нейроповеденческих тестов, иммуноферментный анализ для определения уровней кортикостерона, количественный ПЦР-анализ для оценки экспрессии генов, иммунопреципитация хроматина с использованием

антител к  $\text{H3K4me3}$  и анализ транскриптома в образцах префронтальной коры мышей. Автором представлен подробный дизайн каждой серии экспериментов, описаны и обоснованы методы статистической обработки.

Третья глава диссертации посвящена описанию собственных результатов исследования, четвертая глава анализирует и интерпретирует полученные результаты в свете имеющихся литературных данных.

Выводы отражают основные результаты диссертационной работы. Список литературы включает 379 источников. Таким образом, диссертационная работа выполнена и оформлена согласно требованиям, предъявляемым к диссертационным работам. Автореферат соответствует тексту диссертации, публикации автора полно отражают основное содержание работы.

**Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.** Достоверность полученных результатов основана на достаточном по объему и репрезентативности экспериментальном материале, обеспечена соответствующим дизайном исследования, включающим две валидные модели раннего постнатального стресса и хронического стресса во взрослом возрасте, обоснованном формировании групп сравнения, грамотным использованием современных методов исследования (иммуноферментный анализ, количественный ПЦР-анализ, иммунопреципитация хроматина, анализ транскриптома, автоматизированная видеорегистрация и анализ поведения животных). В работе применены адекватные методы статистической обработки.

Сделанные автором выводы обоснованы и соответствуют поставленным задачам. Выводы и выносимые на защиту положения основаны на полученных результатах. Новизна результатов, основных положений и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывают сомнений.

Материалы диссертационного исследования в необходимом объеме представлены в публикациях. Результаты, полученные в ходе работы, опубликованы в 11 статьях из перечня журналов, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, РИНЦ. Кроме того, автор представил основные результаты и положения диссертационного исследования на профильных общероссийских и международных конференциях.

**Значимость результатов, полученных автором, для науки и практики.** Работа имеет значение для фундаментальной науки в области функциональной нейрогеномики. Решетниковым В.В. сформулированы выводы и положения, которые вносят существенный вклад в представления о генах-мишенях и сигнальных путях, изменяющихся под действием раннего постнатального стресса, что расширяет представления об отсроченных эффектах ранних стрессорных воздействий 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. Полученные результаты могут иметь практическое значение для медицины при разработке терапевтических подходов, корректирующих влияние стресса. Теоретические положения исследования могут быть использованы в курсах лекций и учебных пособиях для студентов биологических и медицинских факультетов ВУЗов.

**Замечания и вопросы по диссертации.** В ходе прочтения диссертации возникли следующие замечания и вопросы дискуссионного характера.

**Замечания:**

1) Выбор теста на депрессивноподобное поведение представляется не удачным, поскольку выявлено снижение общей двигательной активности мышц после стресса в раннем возрасте, которое может оказывать влияние на поведение в тесте принудительного плавания. Тест на ангедонию (предпочтение сахарозы) представляется в данном случае предпочтительным.

2) Сопоставление 648 ДЭ генов, полученных на основе анализа транскриптома, и 70 генов с измененными профилями H3K4me3 у животных с постнатальным стрессом по сравнению с контрольными показало, что только 4 гена (*Tubala*, *Pclo*, *Rbm5*, *Cst3*) пересекаются между двумя этими списками генов. К сожалению, данный интересный и важный результат не получил дальнейшего развития в работе (не проведено расширенное исследование транскрипции этих генов с помощью ПЦР анализа) и должного анализа в обсуждении результатов.

3) В списке литературы присутствуют разные межинтервальные отступы, сбивка нумерации (пронумерована отдельно часть ссылки - № 9, 37, 85, 136, 248); в автореферате указано 378 литературных источников вместо 379. Отвлекают внимание при чтении ссылки на собственные публикации (Reshetnikov et al., 2018; Reshetnikov, Bondar, 2021; Reshetnikov et al., 2020a и др.), которые заявлены как результаты диссертации и указаны в списке публикаций автора в автореферате. В тексте присутствуют опечатки и синтаксические ошибки, неудачный перевод английских терминов (буфер для ревертирования и т.п.).

**Вопросы:**

1) В разных экспериментах для количественного ПЦР-анализа использовали разные гены «домашнего хозяйства». Чем был обоснован выбор генов в разных сериях?

2) Являются ли, по мнению соискателя, выявленные молекулярные изменения в префронтальной коре у мышей после стресса в раннем постнатальном возрасте универсальной реакцией, могут ли результаты быть экстраполированы на другие виды, включая человека?

3) В недавней работе соискателя с соавторами (2020) «Genes associated with cognitive performance in the Morris water maze: an RNA-seq study», которая не вошла в диссертацию, проведено исследование дифференциально

экспрессирующихся генов у мышей, различающихся по выраженности когнитивной функции в тесте Морриса. Поскольку одним из основных эффектов раннего постнатального стресса было ухудшение когнитивной функции в тесте Морриса, возникает вопрос о соответствии изменений выявленных в этих исследованиях.

Вышеизложенные замечания и вопросы не являются существенными и не снижают значимости проведенного исследования. Принципиальных замечаний к содержанию и оформлению диссертационной работы нет.

**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», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика, является законченной научно-квалифицированной работой, направленной на решение научной задачи определения эпигенетических механизмов раннего постнатального стресса в мозге у мышей, имеющей существенное значение для генетики.

По актуальности, научной новизне, методическому уровню, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте изложения материалов работы в печатных изданиях диссертационная работа Решетникова Василия Владимировича полностью соответствует требованиям пп. 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (с последующими редакциями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика.

д.б.н.

Мария Александровна Тихонова

Главный научный сотрудник, заведующая лабораторией нейробиологических механизмов нейродегенеративных процессов НИИНМ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» (НИИНМ)

630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4,

Телефон (383) 373-01-79

Факс (383) 335-97-54

e-mail: tikhonovama@neuronm.ru

1.03.2024.

Подпись Тихоновой М.А. заверено  
специалист по кадрам det.tikhonova  
05.03.2024