

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по НИР ФГБОУ ВО

«Саратовский национальный
исследовательский государственный
университет имени Н.Г. Чернышевского»

доктор ф.м.н., профессор
Алексей Александрович Короновский

« 31 » 01 2018 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» Министерства образования и науки РФ о научной и практической значимости диссертационной работы Лопатиной Ольги Леонидовны на тему: «Окситоцин-опосредованные механизмы регуляции социального поведения и развития тревожных состояний», представленной к защите в диссертационный совет Д 002.020.01 при ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология (биологические науки).

Актуальность темы. Прогрессивный рост нейропсихических расстройств в современном мире на фоне крайней лимитированности в методах изучения и терапии таких состояний, как повышенная тревожность, аутизм, агрессия и др. требует развития новых экспериментальных моделей психо-неврологических расстройств и методов изучения социального поведения у животных. Поиск новых фармакологических мишеней и инновационных стратегий в эффективной коррекции указанных психических состояний являются приоритетными задачами нейропсихологии и практической психиатрии. Одной из острых социальных проблем является неуклонный рост детей с аутизмом. К примеру, за последние 10 лет численность таких детей возросла в 67 раз. Депрессия в городах с высоким темпом жизни достигает эпиде-

миологических значений, но по-прежнему остается за пределами научного понимания механизмов развития и потому без надежного прогнозирования и разработанной терапии.

Эти факты свидетельствуют о высокой актуальности и своевременности диссертационного исследования Лопатиной О.Л.

Научная новизна. Впервые автор диссертации на основе применения оригинальных моделей нарушения сложных форм поведения у мышей, изучил молекулярные окситоцин-опосредованные механизмы нарушения социального и эмоционального поведения, а также предложил возможные пути коррекции неройпластичности и стресс-устойчивости, лежащие в основе развития тревожных состояний. Впервые доказана роль окситоцина в механизмах регуляции характера и взаимодействия единиц функциональных системы формирования социального поведения. Не имеющих аналогов автором представлены научные результаты о роли меластатин-связанных каналов транзиторного рецепторного потенциала (МСТРП) и окситоциновых рецепторов при их активации в условиях нормы и при стрессорных состояниях. На основании полученных данных разработано теоретико-экспериментальное обоснование о рассмотрении МСТРП в качестве мишеней для фармакологической коррекции заболеваний, ассоциируемых с нарушением психоэмоционального состояния. В оригинальных исследованиях установлено, что ген *Cd157* опосредует состояние тревожности и определение уровня его экспрессии может явиться новым подходом в раннем прогнозировании и надежной диагностики нарушения эмоционального и психологического баланса, граничащие со срывом процессов адаптации к стрессу. Наряду с *Cd157*, впервые выявлено, что ген *Cd38* повышает стресс-устойчивость за счет модуляции процессов нейропластичности и пролиферации.

Таким образом, автором диссертации представлены принципиально новые научные данные о роли окситоцина в лимбико-гипоталамо-гипофизарном управлении сложных социального и эмоционального поведения животных на разных этапах онтогенеза, а также при формировании забо-

леваний, ассоциированных с нарушением социального поведения и эмоциональной сферы.

Теоретическая, практическая значимость и внедрение результатов исследования в практику. Получены новые фундаментальные знания об окситоцин-опосредованных механизмах управления сложного поведения животных в условиях нормы и формирования нарушений поведенческого и эмоционального состояния. Результаты являются научной платформой для развития новых моделей на животных развития заболеваний центральной нервной системы, ассоциируемых с нарушением эмоционального баланса и социального поведения; поиска новых мишеней для коррекции указанных состояний; разработки клеточных и молекулярных моделей изучения механизмов формирования стрессорных состояний. Эти данные послужат основой для формирования новых стратегий в диагностике и лечении нейропсихологических заболеваний. Обнаружены новые фармакологические мишени, такие как МСТРП для развития инновационных фармакологических стратегий в коррекции тревожных и стрессорных состояний, а также для раннего их прогнозирования и диагностики на основе определения экспрессии Cd157. Эти данные будут полезны для развития новых терапевтических подходов в неврологической и психиатрической практике вышеуказанных заболеваний.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

По объему и содержанию проведенных исследований представленная работа соответствует современному уровню. В ходе проведения исследований диссертантом использован адекватный набор современных экспериментальных, модельных, биохимических, оптических, морфологических хорошо апробированных методов.

По теме диссертации опубликовано 26 научных трудов, в том числе 21 статья в журналах, рекомендуемых ВАК РФ, изданы 2 монографии.

Достоверность принципиальных научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, базируется на достаточно большом материале экспериментальных исследований и результатах их статистической обработки, убедительна и не вызывает сомнений.

Соответствие работы требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. О соответствии диссертационной работы Лопатиной О.Л. требованиям, предъявляемым ВАК РФ к докторским диссертациям, свидетельствует, прежде всего, теоретическая и практическая значимость результатов данных исследований.

Во введении раскрыта актуальность темы, определены цели и задачи исследования, сформулированы научная новизна и практическая значимость работы.

Первая глава представляет собой обзор литературы посвященного поиску векторов исследования на основе изучения роли окситоцина в модуляции поведения человека и животных, его вовлечения в мембранные и клеточные сигнальные процессы. Автор освещает вопросы, связанные с участием бифункционального рецептора $Cd38/cADP$ -рибозы в процессах высвобождения окситоцина в кровь, что иллюстрирует схемами. Обсуждаются механизмы окситоцин-опосредованного управления эмоциональной сферой и поведением человека и животных, что также подкрепляется схемами и наглядными иллюстрациями. Описывается функциональное взаимодействие между МСТРП, $cADP$, Ca^{2+} и внутриклеточной сигнализацией при возбуждении окситоциновых рецепторов.

Вторая глава диссертации посвящена методам экспериментального исследования. В ней представлен дизайн экспериментов и достаточно информативно описаны объекты исследования, а также подготовка животных к опытам; экспериментальные модели, применяемые в ходе научных работ; подходы для проведения исследований *in vitro*, а также тесты, применяемые для оценки социального поведения, уровня тревожности и эмоциональной сферы животных. Описываются биохимические методы определения уровня

окситоцина в крови, в спинномозговой жидкости, в тканях мозга, а также анализа активности цАДФ в мозге. Описываются методы экзогенного введения окситоцина, ПЦР анализа, выделения специфичных антител к *Cd157*, иммуно-гистохимические подходы и трансфекции; статистические методы обработки полученных научных результатов.

В главах 3 и 4 диссертационной работы приведены результаты собственных исследований автора и их обсуждение.

Глава 3.1 включает в себя результаты по изучению поведения *Cd157*-/- мышей. Показано, что у *Cd157*-/- мышей развивается депрессивно-подобное состояние, которое характеризуется высоким уровнем тревожности в новой среде, пониженным интересом (социализации) к несоциальному (социальному) объекту, сниженной двигательной активностью, социальным избеганием и искаженным социальным предпочтением, нарушениями внимания и сенсорным восприятием. Приведены положительные результаты фармакологической коррекции указанных состояний при помощи диазепама и миртазамина. Показана коррекция пониженного уровня социализации путем экзогенного введения окситоцина.

Глава 3.2 содержит результаты по изучению экспрессии *Cd157* на разных этапах развития мышей. С помощью иммуногистохимического анализа установлены области мозга с наиболее высокой экспрессией *Cd157*.

Глава 3.3 включает результаты исследований по изучению ферментативной активности *Cd157*, в которых показало, что эти процессы связаны с производством цАДФ-рибозой.

Глава 3.4 посвящена выявлению в опытах на мышах ферментативной активности цАДФ-рибозы и влияние на эти процессы окситоцина. Показано, что его содержание в плазме крови у *Cd157*-/- мышей ниже, чем в контроле. Экспрессия *Cd157* мРНК заметно снижается, в то время как экспрессия *Cd38* мРНК нарастает к 14 дню постнатального развития.

Глава 3.5 включает результаты, показывающие, что *Cd157* и *Cd38* участвуют в пролиферации нейрональных клеток. При этом *Cd157* не влияет на количество незрелых нейронов, тогда как *Cd38* оказывает противоположное

влияние. Развитие нейродегенерации сопровождается увеличением экспрессии Cd38 и Cd157 в клетках микроглии. Показано увеличение экспрессии Cd38 в S100beta+ астроциты.

Глава 3.6 содержит результаты по изучению особенностей развития Cd157 нокаутных мышей в период грудного вскармливания. Установлен дефицит ультразвуковой вокализации у Cd157^{-/-} мышей. Показано, что фармакологическая коррекция указанного процесса на начальных этапах онтогенеза с помощью внутрибрюшинного введения окситоцина Cd157^{-/-} мышам на 7 и 10 день постнатального развития восстанавливает качественный состав вокализации до уровня контрольной группы.

Глава 3.7 включает результаты по изучению особенностей развития Cd38 нокаутных мышей в период грудного вскармливания. Показано, что у Cd38^{-/-} мышей частично сохраняется способность к социальному взаимодействию с другими особями. При этом уровень окситоцина в крови Cd38 нокаутных мышей до 2 месяцев развития не изменялся. Поэтому фармакологическая коррекция ультразвуковой вокализации и локомоторной активности у мышей линии Cd38^{-/-} не требовалась. Однако, после 2 месяцев постнатального развития, когда мышам отлучали от матери, отмечалось падение уровня окситоцина.

Глава 3.8 содержит экспериментальные данные *in vitro* о модуляции цАДФ-рибозой и окситоцином содержания Ca²⁺ в нейрональных клетках грызунов NG108-15 (клетки нейробластомы мыши x клетки глиомы крысы), экспрессирующие CD38, но не окситоциновые рецепторы. Показано температуро-чувствительное повышение внутриклеточного Ca²⁺ под воздействием цАДФ-рибозы и окситоцина. На клетках NG108-15 с трансфекцией кДНК рецепторов окситоцина человека установлено, что цАДФ-рибоза является вторичным мессенджером рецепторов к окситоцину.

Глава 3.9 посвящена изучению роли цАДФ-рибозы и температуры в механизмах высвобождения окситоцина через CD38 и TRPM2 в гипоталамусе мышей, включая социальный и психологический стресс. Доказано,

что высвобождение окситоцина стимулируется цАДФ-рибозой, где оба белка CD38, и TRPM2 играют важную роль.

Общие выводы отражают основные результаты исследований, проведенных автором, и свидетельствуют о выполнении задач, поставленных во введении. Список цитируемой литературы составлен в соответствии с требованиями действующего ГОСТа.

Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению диссертации.

Диссертационная работа изложена на 277 страницах компьютерного текста, содержит 5 таблиц, 81 рисунок, состоит из глав «Введения», «Обзора литературы», «Объектов и методов исследования», 9 глав результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, общих выводов, списка литературы, включающего 423 источника, из них – 40 отечественных и 383 на английском языке.

Изложение материала диссертации приводится в традиционной для экспериментальных работ форме: после введения и обзора литературы следуют материалы и методы, данные собственных исследований автора, которые завершаются обсуждением полученных результатов, заключением, общими выводами и списком литературы. Работа оформлена аккуратно, эстетично, с применением компьютерной графики. Оформление работы соответствует требованиям ВАК.

Однако наряду с достоинствами в работе имеются замечания и вопросы:

1. Имеются главы с неполным отражением смысла. К примеру, в литературном обзоре есть глава «Вовлечение окситоцина во внутриклеточные каскады». Каскады чего, каких именно процессов? В главе 3.8.2 «Ингибирование путем удаления внеклеточного кальция и TRPM2 антагонистом». Ингибирование чего? Рекомендовано внести исправления.
2. В методах описывается протокол по взятию спинномозговой жидкости из цистерны магна. Какой объем спинномозговой жидкости брали для исследований?

3. Автор исследует роль CD157, белок, контролируемый семейством генов CD38 NAD+гликогидролазой/цАДФ-рибозы, в развитии тревожного состояния. Чем автор объясняет выбор для коррекции этого состояния диазепам, который действует на ГАМК рецепторы и мirtазамин, который оказывает антидепрессантное действие через серотонинергические 5-HT₂-рецепторы. Как это взаимосвязано с CD157 и как можно объяснить постановку данной научной задачи?
4. Чем автор может объяснить тот факт, что такой сильный звук 90 дБ, который достаточный для открытия гематоэнцефалического барьера, оказался неэффективным для стимуляции страха и испуга у мышей дикого типа? Какая частота звука применялась при этом? Автор пишет «Реакция испуга была значительно повышена у накаутных мышей по сравнению с мышами дикого типа (предварительный импульс – 0 дБ)? Это было воздействие без звука?

Заключение

Диссертация Лопатиной Ольги Леонидовны: «Окситоцин-опосредованные механизмы регуляции социального поведения и развития тревожных состояний», представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – «Физиология» (биологические науки), выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Салминой А.Б. и M.D., PhD, профессора Хигашида Харухиро, является научно-квалификационной работой, в которой представлено решение важной и актуальной для физиологии проблемы, связанной с поиском окситоцин-зависимых механизмов регуляции социального поведения и коррекции тревожных состояний.

Диссертационная работа Лопатиной Ольги Леонидовны по актуальности, научной новизне, практической значимости решенной проблемы, уровню апробации и опубликованию основных положений в печати, соответствует требованиям п.9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней»,

предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – «Физиология» (биологические науки).

Отзыв обсужден на заседании кафедры физиологии человека и животных Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» Министерства образования и науки РФ (протокол № 6 от 31.01.2018 г.).

Зав. кафедрой физиологии человека
и животных биологического факультета
ФГБОУ ВО «Саратовский национальный
исследовательский государственный
университет имени Н.Г. Чернышевского»
доктор биологических наук
профессор



Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна

" 31 " января 2018 г.

410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83.
Телефон: (8452) 51 - 92 - 20
E-mail: glushkovskaya@mail.ru

