

Отзыв официального оппонента

Сарапульцева Алексея Петровича, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника, заведующего лабораторией иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН»

на диссертацию Шалагиновой Ирины Геннадьевны «МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ПОСТСТРЕССОРНЫХ НАРУШЕНИЯХ ПОВЕДЕНИЯ У ЛИНИЙ КРЫС С КОНТРАСТНОЙ ВОЗБУДИМОСТЬЮ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ», представленную в Диссертационный совет 24.1.137.01 по защите кандидатских и докторских диссертаций при ФБГУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности физиология человека и животных (1.5.5)

Актуальность

В последние годы, несмотря на существенные достижения в диагностике и терапии, депрессия и депрессивно-подобные состояния становятся настоящим вызовом для системы здравоохранения и общественного здоровья. Более того, недавняя пандемия COVID-19 существенно усугубила данную проблему, вызвав взрывной, практически трехкратный рост встречаемости патологии (Ettman et al., 2022).

Наблюдаемый рост тревожно-депрессивных расстройств после эпидемии лишь частично связан с действием таких факторов, как социальная изоляция, экономическая неопределенность и переживания людей; также он являлся следствием самого патологического процесса, который сопровождался развитием системной воспалительной реакции и нейровоспаления (Gusev E et al, 2021-2023). Пандемия COVID-19, привлекла пристальное внимание к процессам нейровоспаления как неотъемлемому компоненту вирусной инфекции, проявляющейся синаптической дисфункцией, изменениями межклеточных взаимодействий, деградацией макромолекул, нарушениями метаболизма и последующей нейродегенерацией (Путилина МВ, Гришин ДВ, 2020; Braga j et al 2023; Kempuraj D et al 2020). Нейровоспаление, сопровождающееся активацией врожденной иммунной системы, связано с тяжелой депрессивной симптоматикой, повышенной заболеваемостью и смертностью (Maes M et al., 2012); при этом, выявляются корреляции между повышенным уровнем провоспалительных цитокинов в сыворотке и спинномозговой жидкости и тяжестью депрессии, а также резистентностью к лечению (Osimo et al., 2019). Более того, подавление выраженности воспалительной реакции, экспрессии цитокинов и выравнивание нитро-окислительного баланса показало многообещающие результаты в облегчении депрессии (Gazal et al., 2013). Показатели возбудимости нервной системы также определяются как фактор риска развития тревожно-депрессивных и постстрессовых расстройств. Также, в исследованиях подчеркивается роль микробиоты кишечника при депрессии—депрессивные расстройства ассоциируются уменьшением разнообразия микробиоты кишечника, в то время как трансплантация фекальной микробиоты от пациентов с депрессией может вызывать нарушения поведения (Jiang et al., 2015; Zheng et al., 2016), а воздействие на микробиоту—оказывать антидепрессивное действие (Diaz et al., 2011; Bravo et al., 2011).

Однако, точные механизмы, связывающие воспаление и депрессию, еще не полностью изучены, и требуют проведения новых исследований. Более того, не существует общепринятых диагностических критериев депрессии, связанной с воспалением (за исключением уровня периферического С-реактивного белка (СРБ), превышающего 3 мг/л). Вследствие этого, понимание воспалительных коррелятов депрессии имеет потенциал для выяснения основных

патофизиологических механизмов и содействия разработке новых биомаркеров и способов терапевтических вмешательств.

Цель и задачи исследования

Цель работы И.Г. Шалагиновой сформулирована корректно: «изучить ряд признаков нейровоспаления и состав микробиоты кишечника, их возможную роль в процессах адаптации /дезадаптации к длительному эмоционально-болевого стрессу в связи с наследственно обусловленным высоким и низким уровнем возбудимости нервной системы у крыс».

Задачи, поставленные в исследовании, полностью соотносятся с целью и охватывают все аспекты проблемы в пределах использованных методических подходов.

Научная новизна

В данной работе впервые было показано и проанализировано влияние эмоционально-болевого стресса различной длительности на выраженность периферического воспаления и нейровоспаления в структурах мозга, вовлеченных в развитие постстрессорных нарушений, а также специфическая динамика протекания постстрессорного нейровоспаления у крыс с разной возбудимостью нервной системы. Было выявлено, что высоковозбудимый фенотип животных отвечает на хронический стресс ярко выраженной воспалительной реакцией, которая сопровождается активацией микроглии, а также снижением уровня экспрессии мРНК гена *bdnf* в префронтальной коре. Также, были получены новые данные о разнообразии и составе микробиоты кишечника у крыс с разной возбудимостью нервной системы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая и практическая значимость исследования не вызывают сомнений. Фундаментальное биологическое значение работы заключается в получении новых данных о механизмах развития постстрессорных психических дисфункций. Полученные данные подтверждают, что генетически детерминированный уровень возбудимости нервной системы является фактором риска развития постстрессорных поведенческих нарушений. Проведенный автором анализ микробиоты позволяет сформировать методические основы для развития таргетной терапии, в том числе и с применением пробиотических препаратов новых поколений. Известно, что результаты диссертации включены в учебные курсы «Генетика поведения» и «Биологические основы психических расстройств», читаемых для студентов бакалавриата и специалитета БФУ им. И. Канта, а также размещенных на открытой платформе stepik.org.

Методы исследования, достоверность и апробация полученных результатов

Работа выполнена с применением набора физиологических, а также передовых молекулярных и иммуногистохимических методов исследования, которые, как показывает их детальное описание, автор хорошо освоила. В частности, освоен метод ПЦР в реальном времени для изучения уровня экспрессии целевых генов и методы иммунофлуоресцентного окрашивания. Также освоена работа и методы оценки полученных результатов с экспериментальными животными, которые подвергались психогенному длительному эмоционально-болевого стрессированию (ДЭБС) по протоколу К. Гехта. Достоверность полученных результатов и выводов подтверждается, прежде всего, методологией исследования. Адекватный набор методов обеспечил точность и воспроизводимость полученных данных. Статистическая достоверность выявленных эффектов подтверждена применением необходимых критериев. Работа прошла серьёзную апробацию на шести отечественных и международных профильных конференциях. Все это в целом подтверждает достоверность полученных выводов.

Структура диссертации.

Рукопись построена по классическому плану. За Введением следует Обзор литературы на 39 страницах (Глава 1), охватывающий все аспекты проблемы. В Главе 2 излагаются Материалы и методы исследования, о которых было сказано выше. Результаты исследования представлены в Главе 3. В Главе 3 Раздел 3.1 описывает межлинейные различия в уровне возбудимости нервной системы исследуемых линий крыс. Разделы 3.2 и 3.3 описывают влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на поведение крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» и характеристики воспаления у крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в разные сроки после длительного эмоционально-болевого воздействия. В Разделе 3.4. представлены показатели разнообразия и представленность микроорганизмов в стуле крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в норме и в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессирования. Результаты экспериментов суммированы, проанализированы и сопоставлены с литературными данными в Главе Заключение. Автор заключает, что длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие вызывает специфические долгосрочные тревожно-подобные поведенческие нарушения, ассоциированные с генетически детерминированным высоким и низким уровнем возбудимости нервной системы крыс, при том, что признаки постстрессорного воспаления более выражены у высоковозбудимых крыс (линия НП) по сравнению с низковозбудимыми (линия ВП). Завершают рукопись Выводы и Список литературы.

Личный вклад автора

Анализ рукописи и сопоставление глубины и профессиональности изложения различных этапов исследования позволяет утверждать, что все разделы написаны автором самостоятельно. Также автор внесла основной вклад в разработку концепции, экспериментальную работу и анализ результатов.

Стиль и оформление; публикации по теме диссертации.

Рукопись занимает 142 страниц машинописного текста, включая список сокращений и литературы (210 источников). Работа иллюстрирована 35 рисунком. Диссертация и автореферат написаны в хорошем научном стиле, число опечаток минимальное. Оформление соответствует требованиям ВАК. По материалам исследования опубликовано 6 статей, что также удовлетворяет требованиям ВАК.

Вопросы и замечания для дискуссии

Принципиальных замечаний и возражений по поводу рукописи нет. В то же время есть вопросы для дискуссии.

1. Сколько всего животных участвовало в эксперименте? В материалах и методах не плохо было бы прописать группы и количество животных.
2. Необходима подробная схема, где будет показано сколько животных всего участвовало на каждой временной точке и в каждом исследовании. Логичнее всего сделать не 4 группы а 16 (например, контроль ВП 1, контроль ВП 7, контроль ВП 24, контроль ВП 60 и т.д.). Для каждой из групп указать общее количество животных и количество животных, участвующих в том или ином исследовании, например, контроль ВП 1 (n=50): ПКЛ (n=12), кровь (n=8) и т.д.
3. Почему поведенческие тесты проводились в утренние часы? Крысы – ночные животные и для них активность характерна во второй половине дня. Тесты ПКЛ и ОП проводились в один день?
4. Почему группы отличаются по численности?

5. В материалах и методах нет метода определения возбудимости, результаты которого указаны в главе «Результаты»
6. Почему нет множественного сравнения групп в поведенческих тестах? Идет только попарное сравнение.
7. Как Вы можете объяснить появление тревожного поведения у ВП животных на 60 сутки? С чем оно связано и почему выявлено только в тесте «Открытое поле», тогда как тест ПКЛ не показал никаких достоверных отличий.
8. Почему Вы не исследовали микробиоту на 60 сутки? Тем более что изменение поведения у линии ВП наблюдалось именно в это время.
9. Рис 29. Не понятно почему животные одной и той же линии до стресса (при сравнении контроль ВП/ ВП стресс до стресса – т.е., по сути, тот же контроль) имеют достоверные отличия.

Заключение

На основании представленных материалов утверждаю, что диссертационная работа Шалагиновой Ирины Геннадьевны является завершенным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, в котором содержится решение научных задач, связанных с изучением новых данных о механизмах развития постстрессорных психических дисфункций. Полученные автором приоритетные данные имеют значение для фундаментальной физиологии, а также имеют практическое значение, поскольку уточняют патогенез распространенных стресс-опосредованных заболеваний. Работа написана автором самостоятельно и подчинена единому плану.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 № 842 (с изменениями от 11.09.2021 г., №1539), утвержденного Постановлением Правительства РФ, а ее автор, И.Г. Шалагинова, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5—физиология человека и животных.

20.09.2023

Сарапульцев Алексей Петрович,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник,
заведующий лабораторией иммунопатофизиологии
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН»
620049, Российская Федерация, г. Екатеринбург ул. Первомайская, 106.
Телефон (факс): +7(343)3740070.
e-mail: alex.sarapultsev@yandex.ru

