

ОТЗЫВ
официального оппонента Крупиной Наталии Александровны
на диссертацию Квичанского Алексея Андреевича
«Возрастная динамика экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением и реакцией на стресс, у крыс в модели неонатального провоспалительного стресса»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.5. «Физиология человека и животных» (биологические науки)

Актуальность темы исследования

Диссертационное исследование А.А. Квичанского выполнено в рамках фундаментальной медико-биологической проблемы изучения патогенеза депрессивных расстройств, и, в частности, участия системы стресс-реактивности и нейровоспаления в процессах развития таких состояний.

Депрессия вносит значительный вклад в глобальное бремя болезней в сообществах людей разных социальных слоев по всему миру, затрагивая все возрастные группы: от детского и подросткового возраста до пожилых людей, причем с возрастом распространенность депрессии в популяции растет. От депрессивных расстройств, по разным оценкам, страдают более 350 миллионов человек в мире. Заболевание является одной из лидирующих причин инвалидизации, что представляет серьезную медикосоциальную проблему, которую усугубляет недостаточная эффективность современной фармакотерапии депрессий.

Стресс считается одним из основных триггерных факторов психических нарушений, в первую очередь, таких как депрессивные расстройства. Доказана двунаправленная связь между стрессом и иммунной системой: некоторые нервно-психические расстройства, включая депрессию, могут быть вызваны воспалением, а ЦНС может контролировать иммунный ответ. Признаки воспаления обнаруживают примерно у 30-50% людей с депрессией. Накоплен большой массив данных, свидетельствующих об участии системы нейровоспаления в патогенезе депрессивных состояний, что происходит во взаимодействии со стресс-реализующими системами организма. В качестве стандартных маркеров активации нейровоспаления часто используют показатели повышения экспрессии цитокинов с провоспалительным действием, а в качестве маркеров состояния стресс-реализующих систем – уровень экспрессии глюкокортикоидных и минералокортикоидных рецепторов, кортикотропин-рилизинг фактора и др.

Данные последних лет, подтверждающие связь между стрессом, депрессией и нейровоспалением, открывают новые возможности для изучения нейробиологических механизмов развития этих состояний в эксперименте и определения новых мишеней для терапии психических расстройств, связанных со стрессом. Однако до сих пор остается много неясного в механизмах взаимосвязи нервной и иммунной систем при депрессивных состояниях. Также явно недостаточно исследований этих механизмов у особей обоего пола.

В работе А.А. Квичанского была поставлена цель изучить изменения экспрессии стресс-ассоциированных генов в ходе онтогенеза самцов и самок крыс в модели депрессии, индуцированной неонатальным провоспалительным стрессом, что, по

совокупности сказанного выше, определяет данное диссертационное исследование как бесспорно актуальное.

Общая характеристика диссертации, её завершенность

Диссертация построена по традиционному плану, включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и список использованной литературы. Работа изложена на 149 страницах, хорошо иллюстрирована - содержит 50 рисунков, кроме того, представлены 3 таблицы, из них 2 – обобщающие полученные результаты. Список литературы содержит 318 источников, включает 3 отечественных источника (помимо публикаций автора диссертационного исследования) и 315 зарубежных. На мой взгляд, такое соотношение не отражает в полной мере вклад отечественных авторов в изучение поставленной проблемы.

Обзор литературы избыточен по объему, занимает 60 страниц, что значительно превышает средний объем обзора в диссертациях на соискание ученой степени кандидата наук. Обзор включает три крупных раздела, в которых рассмотрены модели депрессивно-подобных состояний на лабораторных животных, современные представления о патогенезе депрессивных состояний и влияние пола на чувствительность к развитию депрессивно-подобных состояний.

В первом разделе (п. 3.1.) диссертант излагает интересные представления о возможности классификации многочисленных экспериментальных моделей депрессивно-подобного состояния по дизайну эксперимента на две большие группы: 1) модели, условно названные автором «острыми», в которых развитие депрессивно-подобного состояния индуцируют действием стресса различной модальности (к ним автор относит поведенческий стресс, его фармакологическую имитацию и воспаление), и 2) модели, в которых индуцируют склонность к депрессивно-подобному поведению (к ним автор относит линии животных с генетическими нарушениями и программирование склонности к развитию депрессивности в поведении путем стрессирования животных задолго до тестирования). Это не общепринятая классификация, и возникают вопросы. Почему диссертант относит к моделям первой группы, определяемым условно как «острые», модели хронического умеренного стресса и социального поражения, модели на основе хронического введения медиаторов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси? Каковы критерии для отнесения моделей в данную группу? К какой группе моделей, по мнению диссертанта, можно отнести модель длительной социальной изоляции, начинающейся в раннем возрасте? Что нового, по мнению автора, привносит такая классификация?

Во втором разделе обзора диссертант рассматривает существующие гипотезы патогенеза депрессий, основанные на нарушении функционирования моноаминовых систем, нарушении нейрогенеза и нейрональной пластичности, работы стресс-реализующих систем и участия нейровоспаления. Приведены современные представления о работе гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и стресс-ассоциированных систем головного мозга, описаны основные белки-маркеры нейровоспаления и состояния микроглии, рассмотрено их участие в патогенезе депрессий. Диссертант в процессе

изложения фактов высказывает много предположений, что свидетельствует о его способности к анализу большого массива экспериментальных данных.

В третьем разделе обзора автор на основе приведенных в первых двух разделах данных обосновывает необходимость изучения дифференциальной чувствительности самцов и самок к индукции депрессии и нейровоспаления.

Фактический материал по всем моделям представлен в обзоре в единой логике, с выделением недостатков той или иной модели, анализом стойкости депрессивно-подобных нарушений и акцентом на возникающих сомнениях при применении рассматриваемой модели. Научные данные о белках-маркерах стресса и нейровоспаления также изложены по единому алгоритму. В целом, качественное представление данных научной литературы свидетельствует об очень хорошей научно-теоретической подготовке диссертанта.

Как следует из раздела «Материалы и методы исследования», в работе были использованы адекватные методы анализа депрессивно-подобного поведения, а также биохимического и молекулярного анализа – количественная ПЦР в реальном времени, Вестерн-блоттинг, иммуноферментный анализ, что подтверждает высокую научно-квалификационную подготовку диссертанта.

Раздел «Результаты» включает 4 подраздела, в которых последовательно приведены данные о нарушениях поведения у взрослых крыс после неонатального провоспалительного стресса, об исследовании биохимических и молекулярно-биологических показателей у взрослых крыс, об исследовании специфичных для отделов гиппокампа изменений экспрессии генов, сопряженных со стресс-реактивностью и нейровоспалением, в латентном периоде развития депрессивно-подобного состояния у крыс в возрасте 18 и 30 суток. Обсуждение результатов завершается кратким заключением и обоснованными выводами, отражающими основное содержание работы в полном соответствии с поставленными задачами, что свидетельствует о завершенности диссертационного исследования.

Научная новизна

В диссертационной работе А.А. Квичанского получены приоритетные данные об изменении у крыс экспрессии ряда генов, связанных с реакцией на стресс и нейровоспалением, в структурах мозга, вовлеченных в поведенческий ответ при развитии депрессивно-подобных состояний на модели неонатального провоспалительного стресса.

Обнаружены половые различия в поведении взрослых крыс: у самцов, но не у самок развиваются признаки депрессивно-подобного поведения – «поведенческое отчаяние» в тесте «вынужденного плавания» и ангедония в тесте «предпочтения сахарозы».

Диссертант в работе использовал прием стресса «двойного удара» – неонатальное введение липополисахарида и острый поведенческий стресс в ситуации «вынужденного плавания» перед выведением взрослых животных из эксперимента. Такой методический прием позволил получить новые данные о половых различиях в состоянии гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и изменениях экспрессии выбранных генов.

Неонатальное введение липополисахарида предотвращало повышение уровня кортикостерона в крови крыс обоего пола в ответ на острый поведенческий стресс.

Диссертант впервые показал, что неонатальный провоспалительный стресс и острый поведенческий стресс сами по себе вызывали у самцов крыс сходные изменения в экспрессии генов, ассоциированных с развитием стресс-ответа и нейровоспаления: в гиппокампе взрослых крыс была повышена экспрессия мРНК гена, кодирующего цитокин с провоспалительным действием ИЛ-6, а во фронтальной коре была снижена экспрессия гена, кодирующего минералокортикоидные рецепторы. При сочетанном стресс-воздействии эти эффекты не были выявлены, но было обнаружено повышение уровня мРНК гена, кодирующего ИЛ-6, во фронтальной коре мозга. Диссертант показал, что неонатальный провоспалительный стресс изменял реакцию ткани фронтальной коры на острый поведенческий стресс: предотвращал снижение экспрессии мРНК гена, кодирующего фактор некроза опухоли альфа, и экспрессии ИЛ-6 во фронтальной коре.

НПС также провоцировал реакцию на острый стресс в структурах мозга взрослых самок крыс, что проявлялось повышением уровня глюкокортикоидных рецепторов, экспрессии гена, кодирующего ИЛ-6, и снижением уровня минералокортикоидных рецепторов во фронтальной коре, а в гиппокампе – снижением экспрессии глюкокортикоидных рецепторов и ИЛ-6.

Очень интересны принципиально новые данные по изменению экспрессии выбранных для анализа генов в онтогенезе. У самцов и самок крыс в возрасте 1 месяца неонатальный провоспалительный стресс вызывал повышение экспрессии мРНК генов, кодирующих глюкокортикоидные рецепторы, в зависимости от области гиппокампа. Разнонаправленные изменения экспрессии других исследованных генов, ассоциированных с ответом на стресс и нейровоспалением, впервые выявлены только у самцов крыс, причем эффект также зависел от области гиппокампа. Обращает на себя внимание тот факт, что только в этом возрасте у самцов, но не у самок в гиппокампе выявлены изменения экспрессии генов, кодирующих фракталкин и его рецептор, что могло быть связано с включением процессов, опосредованных микроглией.

У крыс в возрасте 18 суток неонатальный провоспалительный стресс не изменял экспрессию исследованных генов в структурах мозга.

Таким образом, диссертанту удалось получить первые данные о динамике экспрессии генов, ассоциированных с развитием стресс-ответа и нейровоспаления, в структурах мозга крыс, перенесших неонатальный провоспалительный стресс.

Научно-практическая значимость

Диссертационное исследование А.А. Квичанского вносит вклад в развитие представлений о роли нейровоспаления в формировании повышенной реактивности на стресс и последующего возникновения депрессивно-подобного поведения, что способствует более глубокому пониманию патогенеза такого рода нарушений.

Использованный диссертантом подход, заключающийся в применении двойного стресса – неонатального провоспалительного и последующего отсроченного острого поведенческого, – показал свою эффективность для выявления половых различий в молекулярных механизмах развития ответной реакции. Такой подход предполагает различные модификации и перспективен для практического использования в лабораторной практике моделирования психопатологических нарушений в научно-исследовательских институтах соответствующего профиля.

Результаты исследования возрастной динамики экспрессии генов, кодирующих белки, которые являются маркерами стресс-реактивности и нейровоспаления, открывают возможности для поиска новых подходов к ранней диагностике депрессивных расстройств и разработки их комплексной патогенетической терапии.

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

Результаты получены в хорошо спланированном исследовании на достаточно большой выборке из 111 крыс обоего пола. Поставленные задачи решены в трех экспериментальных сериях по единому четкому плану. Помимо оценки депрессивности в поведении, современными методами молекулярного и биохимического анализа исследовано большое число показателей, дающих комплексную оценку состояния систем стресс-реактивности и нейровоспаления у крыс, подвергнутых неонатальному провоспалительному стрессу. Данные в зависимости от характера распределения значений показателей представлены в виде наложения столбчатых диаграмм или диаграмм размаха и точечных диаграмм. Статистическая обработка данных выполнена с применением современных методов биометрики, с учетом, в случае необходимости, поправки на множественность сравнений. Итоги работы сомнений не вызывают, степень достоверности и обоснованности научных положений и выводов высокая.

Полнота публикаций диссертационного исследования

По результатам исследования опубликованы 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, включая рекомендованные ВАК Минобрнауки РФ по специальности 1.5.5. «Физиология человека и животных» и приравненные к ним публикации. В трех статьях А.А. Квичанский является первым автором.

Автореферат полно отражает содержание диссертационной работы, положения диссертации и оформлен в соответствии с существующими требованиями.

Замечания и вопросы по диссертации

Принципиальных возражений по диссертационному исследованию нет. В тексте встречаются опечатки и неточности, не снижающие ценность проведенного исследования.

При ознакомлении с экспериментальной частью работы возникли следующие вопросы:

- 1) На результаты оценок экспрессии генов при небольших по объему выборках может оказывать влияние наличие родственных связей у особей в группах. Сколько представителей одного помета было в каждой группе?
- 2) Известно, что склонность к развитию депрессивных состояний зависит от пола. В диссертационном исследовании на модели неонатального провоспалительного стресса подтвержден факт половых различий в развитии депрессивно-подобного поведения: оно выявлено только у взрослых самцов крыс, а крысы-самки оказались устойчивы к такому воздействию. Эти данные противоречат сложившимся

представлениям о большей склонности особей женского пола к депрессивным расстройствам, что было показано и в клинике, и в эксперименте. Как можно объяснить полученные в работе результаты?

- 3) Отсутствие признаков депрессивно-подобного поведения у взрослых самок, подвергнутых неонатальному провоспалительному стрессу, при наличии у них изменений экспрессии изученных генов и уровня глюко- и минералокортикоидных рецепторов, а также ИЛ-6 в структурах мозга в ответ на острый стресс может отражать развитие у крыс иных нарушений в поведении, например, тревожности. О высокой частоте взаимосвязи депрессии и тревоги сказано и в обзоре литературы. Почему диссертант решил ограничиться только оценкой депрессивности в поведении трехмесячных крыс и вовсе не оценивать эмоционально-мотивационное поведение у крыс в возрасте 1 месяца?

Сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Квичанского Алексея Андреевича «Возрастная динамика экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением и реакцией на стресс, у крыс в модели неонатального провоспалительного стресса» является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи в области физиологии человека и животных, а именно изучения экспрессии генов, ассоциированных с ответом на стресс и нейровоспалением, в онтогенезе самцов и самок крыс, перенесших неонатальный провоспалительный стресс. По актуальности темы, объему выполненных автором исследований, новизне полученных данных и их научно-практической значимости, опубликованным результатам диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. в действующей редакции, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. «Физиология человека и животных» (биологические науки).

Официальный оппонент
доктор биологических наук,
главный научный сотрудник лаборатории общей патологии нервной системы
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

« 09 » сентября 2022 г.  Крупина Наталия Александровна

Контактные данные: Тел.: +7(917)550-21-55 e-mail: krupina-na@yandex.ru
Адрес места работы: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8, ФГБНУ «НИИОПП»
Тел. рабочий: +7 499 151-1756 e-mail рабочий: niiopp@mail.ru

Подпись д.б.н. Н.А. Крупиной заверяю
ВРИО Ученого секретаря
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,
кандидат медицинских наук

Кожевникова Елена Николаевна

«09» сентября 2022 г. Кожевникова

