

ОТЗЫВ

официального оппонента ведущего научного сотрудника Степаничева
Михаила Юрьевича на диссертацию, представленную на соискание ученой
степени кандидата биологических наук, Абрамовой Ольги Вячеславовны
«Активность нейромедиаторных систем и особенности поведенческого фенотипа у
крыс с опытом ультразвукового пренатального стресса»,
по специальностям 1.5.4. – биохимия и 3.3.3. – патологическая физиология

Актуальность темы диссертации: Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, в мире около 12% населения страдает от психических заболеваний. В Российской Федерации эта величина составляет порядка 1% населения. Это является существенной нагрузкой для экономики практически всех стран, которые, так или иначе, сталкиваются с этой проблемой. В связи с этим особое внимание в последние годы получила проблема возникновения психических расстройств у взрослых людей, являющихся следствием негативного опыта, полученного на самых ранних этапах онтогенеза в эмбриональном, перинатальном и/или неонатальном периоде. На этих этапах, особенно в пренатальный период, происходит быстрое развитие головного мозга, и он является крайне уязвимым для внешнего воздействия. Различные воздействия, которые имеют стрессорный характер, увеличивают риск развития психопатологии у человека. Это в значительной степени подтверждают и исследования на животных, в которых установлено, что пре- и перинатальное влияние стрессирующих факторов различной природы приводит к перепрограммированию многих регуляторных механизмов, следствием чего является проявление тревожного и депрессивно-подобного поведения у взрослых особей. Вместе с тем в повседневной практике для моделирования перинатальных воздействий используются разнообразные факторы физической или химической природы, которые, соответствуя требованиям онтопатогенетической и триггерной валидности, не отвечают требованиям гомологической валидности, т.е. по тем или иным причинам не подходят для представителей исследуемых видов животных. В этом отношении, использование модулированного ультразвукового воздействия в качестве стрессора у крыс, которые используют ультразвук для внутривидовой коммуникации, представляется новым перспективным подходом для моделирования

перинатального стресса у животных этого вида. Таким образом, актуальность представленной диссертации не вызывает сомнений, поскольку в ней предпринято исследование проблемы, представляющей интерес как с точки зрения решения практических задач, стоящих перед обществом, так и с точки зрения реализации новых подходов к решению этих задач.

Целью проведенной соискательницей работы был анализ особенностей развития, поведенческого фенотипа и функционирования нейромедиаторных и нейропептидергических систем у самцов и самок крыс, подвергнутых хроническому пренатальному стрессу, вызванному непрерывным действием ультразвука переменной частоты на беременную самку в течение всего гестационного периода, что полностью соответствует двум заявленным специальностям. Для достижения этой цели О.В. Абрамова поставила несколько конкретных задач, среди которых были изучение влияния хронического стресса, вызванного действием ультразвука переменной частоты, в течение всего гестационного периода на поведение родивших крыс, особенности физического развития и созревания рефлексов у их потомства в раннем возрасте; оценка показателей серотонергической, дофаминергической и норадренергической систем во фронтальной коре и гиппокампе новорожденных и взрослых крыс после воздействия пренатального стресса, вызванного действием ультразвука переменной частоты; оценка содержания нейротрофина из мозга (BDNF) и ряда нейропептидов, а именно: α -МСГ, β -эндорфина, нейротензина, окситоцина и субстанции Р в головном мозге новорожденных крыс и в плазме крови взрослых крыс после воздействия пренатального стресса, вызванного действием ультразвука переменной частоты; изучение особенностей проявления поведенческого фенотипа у крыс в раннем и взрослом возрасте после воздействия пренатального стресса, вызванного действием ультразвука переменной частоты и их взаимосвязи с биохимическими показателями; изучение действия нейролептиков при их хроническом введении на поведенческие реакции взрослых крыс после воздействия пренатального стресса, вызванного действием ультразвука переменной частоты. Таким образом, поставленные задачи позволили провести масштабное исследование последствий пренатального стресса на уровне целого организма и на уровне мозга на разных этапах онтогенеза с использованием большого набора методов.

Новизна научных результатов и положений, выносимых на защиту: Решение этих задач в первую очередь позволило впервые продемонстрировать изменение особенностей физического развития у потомства крыс после непрерывного

ультразвукового пренатального стресса, включая снижение размера помета и увеличение массы тела, впоследствии сопровождающиеся появлением нарушений эмоциональной сферы, социального взаимодействия и ориентировочно-исследовательской активности. Продemonстрирована возможность коррекции выявленных нарушений поведения нейрорептиками. Автором впервые показано, как изменяются уровни серотонина, дофамина, норадреналина и их метаболитов в головном мозге крыс, перенесших хроническое ультразвуковое воздействие в пренатальном периоде. В работе впервые установлено изменение уровней нейротрофина из мозга (BDNF) и ряда нейропептидов, а именно: α -МСГ, β -эндорфина, окситоцина и субстанции Р в головном мозге и в плазме крови крыс, подвергнутых хроническому действию ультразвука в утробе матери.

Анализ структуры и разделов диссертации: Структура диссертации традиционна. Диссертация содержит главы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы, включающий работы на русском (27 источников) и иностранном (393 источника) языках, и одно приложение. Работа изложена на 208 страницах, включая список литературы и приложение, и содержит 18 таблиц и 31 рисунок.

Во введении содержатся все необходимые разделы, позволяющие обосновать актуальность исследования, постановку цели и задач, описывающие новизну полученных результатов, теоретическое и научно-практическое значение работы. Здесь же отражены сведения о публикациях, апробации результатов работы, личном вкладе автора и грантовой поддержке.

Обзор данных литературы достаточно краток, представлен на 27 стр. и содержит шесть разделов, в которых автор рассматривает различные аспекты исследуемой проблемы. Разделы очень отличаются по объему, а выделение некоторых частей обзора в самостоятельные разделы не всегда обоснованно. Например, при чтении раздела 1.1. Понятие о пренатальном стрессе хотелось бы обнаружить четкую формулировку понятия или описания того, что автор понимает под этим и о чем будет писать в дальнейшем. Вместо этого здесь приводятся данные о многочисленных физиологических и патофизиологических проявлениях пренатальных воздействий различной природы, которые классически следует отнести к стрессорным воздействиям или стрессорам, но не стрессу, как ответной реакции организма. Первый раздел обзора посвящен анализу литературы, в которой рассматриваются механизмы, опосредующие эффекты пренатального стресса на

формирование нервной системы и поведения. Здесь приведены сведения о роли биогенных моноаминов, BDNF и нейропептидов в функционировании головного мозга и их реакции на пренатальное действие стрессоров. К сожалению, автор рассматривает эти вопросы довольно поверхностно и, даже упоминая о пренатальном стрессе, практически нигде не приводит информации о природе стрессорного воздействия, хотя и говорит о том, что разные стрессоры вызывают разные последствия. Во второй части автор отмечает значительную противоречивость данных относительно изменений поведения, которые возникают у человека и животных вследствие перенесенного пренатального стресса. В то же время сами эти данные лишь кратко упоминаются без существенного анализа фенотипических проявлений эффектов пренатальных воздействий. Далее О.В. Абрамова переходит к рассмотрению трансляционных аспектов создания животных моделей заболеваний человека. Она отмечает, что моделирование психических нарушений представляет собой значительную проблему, которую не всегда удастся реализовать в рамках только одной конкретной модели. Действительно, пренатальное стрессовое воздействие может воспроизводить симптомы таких патологий, как шизофрения, депрессия, аутизм. В заключительной части обзора литературы соискательница анализирует существующие модели пренатального стресса, в которых в качестве стрессоров используются факторы физической, психологической и информационной природы, рассматривая последнюю как особый вид психологического воздействия. К последнему типу стрессоров автор относит и воздействие ультразвуком переменной частоты, обосновывая это тем, что крысы часто пользуются ультразвуком для внутривидовой коммуникации. К значимым преимуществам этой модели пренатального стресса следует отнести не только гомологическую валидность, оригинальность подхода, при котором модуляция частоты используемого сигнала может нести разную смысловую нагрузку, но и направленность действия стрессора на беременную самку. Подытоживая анализ представленного в диссертации обзора, можно отметить, что в нем, к сожалению, практически не нашли отражения многочисленные работы, проведенные российскими учеными в области исследования последствий пренатального стресса, которые на протяжении многих лет ведутся в лабораториях Санкт-Петербурга и Казани с использованием разных подходов, включая гипоксию и др.

Для проведения исследований в работе применен комплексный подход, основанный на использовании физиологических, иммунологических, биохимических

методов. О.В. Абрамова применила современные методы исследования поведения, позволяющие оценить различные аспекты физического развития, эмоционально-окрашенных реакций животных, их когнитивных способностей. Анализ биохимических показателей проведен с применением твердофазного и хемилюминесцентного иммунологического анализа. Все использованные методы подробно описаны автором в разделе «Материалы и методы». Описание методов работы позволяет воспроизвести все использованные манипуляции, что является безусловным плюсом работы. Протоколы экспериментов сопровождаются графическими схемами, облегчающими восприятие порой довольно сложных последовательностей опытов внутри каждой из проведенных серий. Безусловным достоинством работы является использование для экспериментов животных обоего пола, что полностью соответствует современным тенденциям развития науки. В то же время было бы необходимо предоставить информацию о том, использовали ли для экспериментов первородящих самок или нет, проводили ли выравнивание пометов или нет, описать, каким образом проводили разделение животных по группам, использовали ли методы рандомизации и ослепления. Необходимо было бы указать, какое число животных из каждого помета было использовано для тех или иных экспериментов. В методической части отсутствует обоснование применения непрерывного ультразвукового воздействия в течение всего периода беременности. Из описания не ясно, каким образом оценивали стрессорность использованного воздействия у беременных самок, особенно в свете того, что столь длительное воздействие не привело к заметным сдвигам поведения? Принимая во внимание трансляционный аспект, которому уделено большое внимание в литобзоре, было бы интересно узнать, какое воздействие у человека воспроизводит такая модель пренатального стресса. Кроме того, возражение вызывает интерпретация последнего сеанса выработки латентного торможения как ситуации, аналогичной выработке условной реакции пассивного избегания. В этом случае протокол скорее может соответствовать протоколу выработки классического рефлекса замирания, поскольку избегание чего-либо не предусмотрено условиями организации экспериментального пространства. Протокол обучения в водном лабиринте не соответствует классической методике, предложенной Р. Моррисом, поэтому ссылка на автора в конце протокола представляется некорректной.

Статистический анализ описан недостаточно подробно. Было бы желательно указать какие массивы экспериментальных данных обсчитывали какими методами,

применяли ли анализ мощности для расчета состава экспериментальных групп в соответствии с выбранными статистическими критериями. Исключение – такое описание представлено для результатов обучения в водном лабиринте.

Изложение результатов исследования является иллюстрацией ответов на те вопросы, которые автор сформулировала при постановке задач. Глава содержит 9 подглав с материалами собственных исследований. В первой подглаве автор представила результаты исследования поведения родивших самок контрольной и подопытной групп. Приведенные данные показали, что ультразвуковое воздействие в течение всего периода беременности не вызывало проявления долговременных последствий, которые можно было бы наблюдать уже в первом приближении и, главное, в характере материнского ухода за потомством. В следующем разделе сосискательница демонстрирует, что пренатальное воздействие не повлияло на основные характеристики созревания детенышей за исключением показателей массы тела. Поскольку число рожденных в помете крысят может оказывать влияние на этот показатель развития, информация о том, выравнивали или нет размер помета, представляется важной. Кроме того, в этом разделе отсутствует информация о количественном составе исследованных групп животных в подписи к рис. 5, а из табл. 2 нельзя понять, к какой из исследованных групп относится эта информация. Из табл. 2 также не вполне ясно, что означает «n»? Если число крысят, то почему оно не совпадает с последующими значениями? Следует отметить, что частично эту информацию можно найти в таблицах Приложения, но это возможно не во всех случаях. Не представлены результаты дисперсионного анализа (значение F-статистики и число степеней свободы, уровень вероятности для каждого из исследованных факторов и их взаимодействия), хотя различия между группами обозначены. В разделе 3.2.3 приведены результаты исследования поведения ювенильных крысят в стандартных тестах. О.В. Абрамова показывает, что у крысят перенесенный пренатально стресс приводит к усилению тревожности, снижению времени взаимодействия с матерью и числа социальных взаимодействий с ровесниками. Происходит обеднение репертуара игрового поведения, которое важно для нормального созревания сложных рефлексов. Данные статистического анализа поведения крыс и в тесте «открытое поле», и в тестах на социальное поведение представлены не вполне корректно. В частности, указанные виды расчетных статистик (χ^2 и F) не соответствуют заявленному тесту, использованному для анализа (ранговый аналог дисперсионного анализа Краскела-Уоллеса). Также не

представлены сведения о размере выборок, а в Приложении имеется лишь информация об общем числе протестированных животных из всех четырех групп без конкретного размера выборок.

У взрослых особей, перенесших пренатальный стресс, сохраняется повышенный уровень тревожности, преобладает пассивно-оборонительное поведение. Также сохраняется тенденция к меньшей социализации взрослых особей. Наблюдавшиеся последствия пренатального воздействия были характерны в целом для всей популяции животных и не зависели от пола. Отсутствие заметных эффектов у самцов и самок по отдельности может быть обусловлено большой вариабельностью исследуемых показателей поведения, что, безусловно, оказывает влияние на анализ. Наряду с сохранением повышенной тревожности у взрослого потомства самок, которых облучали ультразвуком отмечено снижение социальных взаимодействий. Депрессивно-подобное поведение не менялось. Интересно, что нарушение латентного торможения и стартл-рефлекса было обнаружено только у взрослых самцов, перенесших пренатальный стресс. Существенных различий в других доменах когнитивной сферы не было выявлено ни у самцов, ни у самок. Необходимо отметить, что большинство отмеченных эмоциональных и когнитивных нарушений купировались применением нейрорептиков.

Базируясь на вышеприведенных данных, О.В. Абрамова выдвигает первое положение о том, что хронический стресс беременной крысы, вызванный непрерывным воздействием ультразвука переменной частоты в течение всего гестационного периода, приводит к развитию патологического поведенческого фенотипа у потомства, включающего нарушения эмоциональной сферы, социального взаимодействия и ориентировочно-исследовательской активности, что в большей степени выражено у самцов, чем у самок. Выявленные поведенческие нарушения частично купируются нейрорептиками. Интересно, что автор указывает на то, что клозапин у взрослых крыс приводит к усилению тревожности, как и гафоперидол, но при этом повышает степень социализации, хотя следовало бы ожидать обратного соотношения между этими формами поведения.

Исследуя механизмы выявленных изменений у потомства, автор остановила выбор на трех системах межклеточной коммуникации: системе биогенных моноаминов, системе нейротрофинов и системе сигнальных пептидов. Это объясняется важной ролью названных систем в процессах созревания, дифференцировки и функционирования клеточных элементов мозга. У

новорожденных крысят, перенесших пренатальное воздействие, отмечались преимущественно изменения уровня серотонина в гиппокампе, но не фронтальной коре без заметных изменений метаболизма серотонина. Для других моноаминов явных различий в содержании и метаболизме выявлено не было. У взрослых животных рост активности серотонергической системы был более выраженным и у самцов, и у самок в обоих исследованных отделах мозга после пренатального стресса. В гиппокампе взрослых самцов также наблюдалось усиление метаболизма дофамина. Содержание норадреналина было выше во фронтальной коре и гиппокампе.

Содержание BDNF было выше в головном мозге новорожденных самцов по сравнению с самками. Перенесенный пренатальный стресс снижал содержание этого нейротрофина у самцов. Не понятно, почему содержание нейротрофина определяли в целом мозге в отличие от моноаминов? Еще более странно то, что у взрослых особей BDNF оценивали только в плазме, но не в мозге. Работа существенно выиграла бы при исследовании экспрессии BDNF в структурах мозга как молодых, так и взрослых крыс.

Далее автор демонстрирует, что пренатальное воздействие не проходит бесследно для пептидергических систем головного мозга крысят, и эти эффекты максимально выражены у самок. У взрослых крыс также определение пептидов было проведено только в крови, что не позволяет проследить возрастную динамику изменений пептидов в головном мозге.

Эти результаты позволили автору выдвинуть следующие положения: пренатальный стресс, вызванный ультразвуком, приводит к изменениям в мозге новорожденных крыс уровня нейротрофина BDNF и нейропептидов, оказывающих влияние как на поведение, так и на постнатальное созревание центральной нервной системы. Профиль наблюдаемых изменений зависит от пола животных: у самцов происходит снижение уровня BDNF, а самок - увеличение уровня α -МСГ, β -эндорфина, окситоцина и субстанции Р; пренатальный стресс, вызванный ультразвуком, приводит к изменению уровня моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов во фронтальной коре и гиппокампе у зрелых животных. Причем только у самок одновременно с этими изменениями наблюдается повышение уровня окситоцина в крови.

Подводя итоги проделанной работы, соискательница делает вывод, что стресс у беременных самок, вызванный хроническим воздействием ультразвука переменной

частоты, который несет информационную нагрузку для грызунов, приводит к ряду негативных последствий для потомства в раннем и взрослом возрасте. С точки зрения нарушения поведенческих реакций самцы показали большую уязвимость, чем самки. Перенесенный стресс усиливал тревожность потомства, в большей степени у самцов, чем у самок, изменял социальное поведение. Эти нарушения возникали в раннем постнатальном онтогенезе и сохранялись у взрослых особей. Следует отметить, что изменения социального поведения особенно ярко проявлялись именно у ювенильных крыс и включали не только снижение стремления к социальным контактам, но и снижение выраженности и феминизацию игрового поведения, а также смещение поведенческих реакций с социального взаимодействия на взаимодействие с неживыми объектами у самцов, переживших пренатальный стресс. Ранний негативный опыт сказался и на созревании центральных нейромедиаторных систем, что, по-видимому, отражается на поведении животных.

Достоверность выводов и рекомендаций: Выводы и положения, выносимые на защиту в целом корректны, основаны на результатах проведенной работы. Достоверность выводов подтверждается использованием адекватных методов решения поставленных задач, глубиной анализа полученных данных, использованием методов их статистического анализа. Некоторые сомнения вызывает формулировка положения 4. Также можно было бы разбить вывод 4 на два в соответствии с сериями экспериментов на ювенильных и взрослых крысах-потомках и изменить формулировку, сделав вывод более общим и констатирующим смысл наблюдаемых явлений, а не только частные наблюдения.

Оценивая практическую значимость полученных результатов, можно отметить, что использованная в работе модель хронического пренатального стресса, вызванного непрерывным действием ультразвука переменной частоты на беременную самку крыс, до некоторой степени воспроизводит особенности психологического стресса беременной женщины в современном обществе и может быть при достаточном обосновании использованных режимов стрессового воздействия рекомендована для использования в трансляционных исследованиях. Что же касается моделирования расстройств психики у потомства таких самок, то с определенной осторожностью можно рекомендовать эту модель в качестве модели некоторых симптомов шизофреноподобных расстройств, расстройств аутистического спектра или антисоциальных расстройств личности. Материалы работы могут быть

использованы при разработке учебных курсов по патофизиологии, нейробиологии и биологии развития.

По материалам диссертации опубликовано три статьи в журналах (одна зарубежная), рекомендованных ВАК РФ или приравненных к ним. Автореферат отражает содержание диссертации.

Следует отметить, что в работе имеется большое число опечаток и ошибок, которые было бы желательно исправить, есть замечания к стилю изложения, представлению материала, но в целом это не снижает качества проделанной автором работы. Большинство сделанных замечаний носят скорее рекомендательный или редакционный характер.

Заключение: Диссертация на соискание ученой степени кандидата наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний, в нашем случае физиологии. Диссертация на тему: «Активность нейромедиаторных систем и особенности поведенческого фенотипа у крыс с опытом ультразвукового пренатального стресса», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук специальностям 1.5.4. – биохимия и 3.3.3. – патологическая физиология, является научно-квалификационной работой, в которой в ходе выполненного автором оригинального эксперимента решена важная для биохимии и патофизиологии задача, связанная с изучением механизмов формирования патологии у животных, перенесших хронический пренатальный стресс. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положение о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., №650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., №1168 от 01.10.2018 г., № 426 от 20.03.2021 г., № 1539 от 11.09.2021 г., № 1690 от 26.09.2022 г., № 101 от 26.01.2023 г.), а ее автор Абрамова О.В. заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук.

Ведущий научный сотрудник
Лаборатории функциональной
биохимии нервной системы
ИВНД и НФ РАН
доктор биологических наук



/ М.Ю. Степаничев/

Подпись М.Ю. Степаничева
Удостоверено.
Ученый секретарь ИВНД и НФ РАН
К.В.Н., г.а.с.



Григорьев Н В

22.11.2023