

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Демина Константина Андреевича на тему: «Нейробиологические основы стресс-индуцированного аффективного патогенеза у *Danio rerio* и его трансляционная взаимосвязь с аффективным патогенезом крыс и человека», представленную на соискание ученой степени кандидата наук по научной специальности 1.5.24. Нейробиология

Стресс как реакция организма на воздействие различных внешних факторов является адаптивным ответом, позволяющим животному адекватно реагировать на изменяющиеся условия среды. В то же время, при длительном стрессорном воздействии могут возникнуть нарушения адаптивного ответа, приводящие к развитию патологических процессов, в том числе в ЦНС. В клинической практике психические расстройства, развивающиеся под воздействием стресса, широко распространены, трудно поддаются лечению и представляют собой одну из острых нерешенных проблем.

Стресс как адаптивный механизм является консервативной системой и широко представлен в ряду позвоночных животных. В целях исследования патологических механизмов развития заболеваний, связанных со стрессом, используют различные животные модели. Представленная диссертационная работа Демина посвящена важной научной теме – механизмам патогенеза, индуцированного длительным хроническим стрессом. Работа выполнена на новой перспективной модели – рыбах *Danio rerio*. Несмотря на то, что эта модель достаточно широко используется в нейрофармакологии, на сегодняшний день данных о валидных моделях действия хронического стресса на этом виде позвоночных недостаточно.

Ценность модели *Danio rerio* обусловлена тем, что у данного вида развиты все основные нейромодуляторные и нейротрансмиттерные системы, характерные для высших млекопитающих. Наличие генетической гомологии *Danio rerio* по отношению к человеку делает эту животную модель перспективной как для генетических, так и для нейрофармакологических исследований. Несмотря на большой объем работ, посвященных механизму развития патологий в ответ на стрессорные воздействия, конкретная роль моноаминергических систем в патогенезе аффективных расстройств и других патологий, связанных с воздействием хронического стресса, остается до конца не выясненной.

Автор представленной диссертационной работы поставил своей целью исследование механизмов развития стресс-индуцированного патогенеза у *Danio rerio*.

Второй целью исследования явился сравнительный анализ экспрессии генов мозга при аффективном патогенезе у человека, крыс и *Danio rerio*, сравнение их межвидовых паттернов.

Научная новизна представленной работы состоит в том, что автор разработал и валидировал большую батарею последовательных стрессорных воздействий, являющую собой модель хронического непредсказуемого стресса у рыб *Danio rerio*. К научной новизне предлагаемого диссертационного исследования следует отнести также разработку нового теста на поведение «отчаяния» у *Danio rerio*, аналогичного тесту на такое поведение у грызунов. Простой и надежный в применении, тест «отчаяния» при подвешивании рыбы за хвост валидирован и доказал свою чувствительность к стрессорным воздействиям и действию антидепрессантов.

Впервые на основе разработанных автором подходов были получены новые данные о нейрохимических изменениях, вызванных хроническим стрессорным воздействием. Начиная с третьей недели хронического стресса у *Danio rerio* развивается устойчивое снижение уровня метаболизма серотонина. Применение антидепрессанта флуоксетина восстановило показатели до уровня контрольной группы, что подтверждает валидность разработанной модели хронического стресса.

Теоретическая значимость диссертационной работы Демина К. А. связана с новыми данными, полученными автором при анализе эффектов хронического стресса на экспрессию генов в мозге *Danio rerio*. Было показано, что хронический стресс приводит к экспрессии части генов, связанных с нейровоспалительными процессами, структурными изменениями в цитоскелете и другими важнейшими процессами. Автором не только выявлены ключевые гены, но также проведен сравнительный межвидовой анализ экспрессируемых под воздействием стресса генов у рыб (*Danio rerio*), грызунов (крысы) и человека (пациенты с депрессивными расстройствами). Выделение автором генов, устойчивых к воздействию антидепрессантов (на примере флуоксетина) является теоретической основой для поиска генетических мишеней при разработке новых лекарственных средств.

Практическая значимость работы состоит в разработке и валидации автором методологического подхода к моделированию хронического стресса на рыбах *Danio rerio*. Такой подход, включающий целый ряд стрессорных воздействий в течение длительного времени (несколько недель), позволяет стандартизировать методику стрессирования и может быть легко воспроизведен в других лабораторных условиях для скрининга веществ при проведении нейрофармакологических исследований. Разработанный автором новый

тест на поведение «отчаяния» у *Danio rerio* также может быть рекомендован для практического использования при скрининге антидепрессантной активности новых препаратов.

Оценка достоверности и обоснованности результатов и выводов диссертации.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, полученные данные подтверждаются достаточным количеством наблюдений. Подготовка и проведение экспериментов, статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием общепринятых методических приемов. Применение современных методов исследования адекватно и полностью соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Выводы диссертационной работы полностью обоснованы.

Характеристика структуры и содержания диссертационной работы.

Диссертационная работа Демина К.А. состоит из трех больших разделов, посвященных различным аспектам последствий хронического стресса у рыб *Danio rerio*.

Глава 1 полностью посвящена разработке нового теста – теста поведения «отчаяния» у *Danio rerio*. Автор подробно описывает методологию проведения тестирования, а также исследует поведенческие особенности и нейрохимические изменения, возникающие в мозге *Danio rerio* в ответ на проведение данного теста. Валидация разработанного теста проведена с использованием антидепрессантов: показано, что как амитриптилин, так и сертралин достоверно увеличивают активность *Danio rerio* в тесте. Также было показано, что данный тест изменяет активность моноаминергических систем мозга рыб: активность в тесте связана с изменениями в серотонинергической и дофаминергической системах.

Глава 2 является исследованием динамики изменений, вызываемой моделью хронического непредсказуемого стресса у рыб *Danio rerio*. Автором проведен подробный анализ изменений поведения и нейрохимических показателей на различных этапах хронического тестирования, показано развитие выраженной тревожности – снижению исследования поверхности воды, а также изменяя метаболизм серотонина. Фармакологическая коррекция наблюдаемых эффектов антидепрессантом флуоксетином свидетельствует о валидации данной модели.

Также было проведено изучение транскриптомных изменений под влиянием хронического стресса, определены основные нарушения в экспрессируемых генах, показана их коррекция после воздействия антидепрессантом. Этот результат особенно интересен, поскольку изменения в экспрессируемых генах могут свидетельствовать о

важности нейровоспалительных процессов, структурных изменений (в белках цитоскелета и адгезии), а также важной роли GPCR в развитии патологий, связанных со стрессорным воздействием.

Глава 3 представленной диссертационной работы посвящена анализу транскриптомных данных, полученных в Главе 2, в сравнении с таковыми для других видов позвоночных (крыса и человек). Такой сравнительный анализ призван выявить эволюционно-консервативные черты патогенеза, связанного со стрессорным воздействием. В данной части диссертационной работы впервые предпринята попытка межвидового анализа изменений транскриптома мозга, возникающих в результате воздействия стресса. Такой подход позволяет выявить возможные общие механизмы в развитии патогенеза. Кроме того, межвидовой анализ важен для определения новых молекулярных мишеней и биомаркеров, ответственных за патогенез стресс-индуцированных расстройств у человека.

В результате проведенного исследования были выделены 6 генов, которые достоверно изменяли экспрессию у всех трех исследуемых видов после стрессорного воздействия, а 5 из этих генов изменили экспрессию на противоположную при применении флуоксетина. В процессе межвидового анализа транскриптома автор обнаружил, что исследование и сравнение наборов генов оказалось более чувствительным, чем определение экспрессии индивидуальных генов, для определения эволюционно-консервативных изменений под воздействием стресса.

Замечания. При всех очевидных достоинствах диссертационной работы, данное исследование обладает некоторыми методическими ограничениями. Следует отметить, что автор сам хорошо понимает сложность в интерпретации полученных результатов, которая возникает вследствие таких ограничений. В первую очередь это тот факт, что сравнение нейрохимических эффектов хронического стресса у рыб *Danio rerio* проводилось на основе анализа целого мозга данных животных, без выделения отдельных структур ЦНС. В то же время сравнение с данными, полученными на грызунах, и данными пациентов с депрессивными расстройствами, проводилось на примере структур гиппокампа данных видов. Безусловно, выделение отдельных структур мозга *Danio rerio* – сложная методическая задача.

Вопрос: планирует ли автор проводить подобные исследования, и возможно ли проведение такого анализа на объектах столь малой величины, как рыбы *Danio rerio*?

Следующее замечание относится к половому составу использованных выборок: оба пола у рыб, самцы у других видов позвоночных. В настоящее время большое внимание, в том числе в области нейрофармакологических исследований, уделяется тестированию лекарственных средств на группах обоего пола, как на самцах, так и на самках.

Вопрос: по какой причине была выбрана смешанная (по половому составу) выборка рыб, в то время как в исследовании на грызунах использовались только самцы? Возможно ли было выбрать для анализа транскриптома данные пациентов обоих полов?

Также из замечаний к работе отмечу значительное число орфографических ошибок и стилистических неточностей в тексте диссертации, некоторое количество повторов. Безусловно, все высказанные замечания носят непринципиальный либо дискуссионный характер и не влияют на общую положительную оценку проведенного исследования.

В заключение следует отметить, что результаты и выводы, полученные в работе, имеют высокую трансляционную и прикладную значимость. Так, разработанный автором тест для определения «отчаяния» у *Danio rerio* может быть использован в качестве надежного и легко воспроизводимого теста для скрининга антидепрессантов нового поколения, а выявленные автором общие эволюционно-консервативные отклонения в транскриптом мозга при аффективных патологиях *Danio rerio*, крыс и человека могут быть использованы в качестве мишеней для разработки новых фармакологических препаратов. Работа Демина К.А. является цельным, законченным научным исследованием, в котором разработаны как практические, так и теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение.

Диссертация Демина Константина Андреевича на тему: «Нейробиологические основы стресс-индуцированного аффективного патогенеза у *Danio rerio* и его трансляционная взаимосвязь с аффективным патогенезом крыс и человека» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Демин Константин Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата наук по научной специальности 1.5.24. Нейробиология. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не обнаружены.

Член диссертационного совета

Д.б.н., ст.научн.сотр.

Биологического факультета СПбГУ

Дата 13.06.2022

А.Б. Вольнова