

ОТЗЫВ

Председателя диссертационного совета

на диссертацию Немеца Всеволода Владимировича на тему: «Изучение дофаминергического компонента стресс индуцированных поведенческих адаптаций», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.5. Физиология человека и животных.

Работа посвящена актуальной проблеме физиологии – выяснению роли дофаминергической и серотонинергических систем в механизмах стресса. Острый и хронический стресс является важным фактором риска в возникновении целого ряда патологических расстройств. Поэтому исследования в этой области имеют большое теоретическое и практическое значение. Современные методы исследования позволяют детально анализировать участие различных нейромедиаторных систем в этих процессах в отношении отдельных областей цнс. В частности, в данной работе изучены особенности функционирования дофаминергических входов в прилежащее ядро в ходе развития стрессорного ответа.

Новые важные сведения были получены при использовании метода быстрой сканирующей вольтамметрии (FSCV *in vivo*), что позволило дать подробную характеристику мезолимбической дофаминергической нейротрансмиссии в норме и под влиянием стрессорного воздействия. Изучен возможный вклад серотонинергической системы в изменения поведения, связанные со стрессом. Показано, что у крыс нокаут по TRH2 усиливается агрессивное поведение и склонность к потреблению спиртосодержащих растворов, особенно в результате стрессирования.

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, главы методов исследования, и пяти глав, в которых излагаются и обсуждаются результаты исследования.

В работе использовался богатый арсенал методов, для решения поставленных задач автор применял как классические методики, так и самые современные. Для изучения поведения животных и оценки локомоторной, и исследовательской активности применялись тесты «открытое поле». Для выявления различий в моторной, исследовательской и прочей активности крыс применялась установка длительной регистрации поведенческой активности крыс «Лаборас». Оценка тревожности у лабораторных животных проводилась с помощью теста «приподнятый крестообразный лабиринт», для выявления признаков депрессивно-подобного поведения у крыс применялся Тест Порсолта. Помимо этого, для ранжирования социального статуса животных использовался тест «Конкуренция за воду». Тест условного рефлекса активного избегания (УРАИ) служил для выяснения роли стратегии поведения в ситуации электрошокового стресса. Среди других поведенческих тестов использовались тесты «предпочтение нового объекта», тест предпочтения раствора сахарозы, тест «отдергивание хвоста» (tail flick), тест «алкогольное спаивание».

Далее, для подтверждения развития стрессорного состояния проводился биохимический анализ сыворотки крови и определение содержания кортикостерона в плазме крови. С помощью иммуногистохимического анализа изучалось распределение

PK N 36-06-543 от 16.05.2025

рецепторов дофамина в неокортексе и стриатуме. Использование в работе генномодифицированных животных потребовало применения методики генотипирования TRH2 нокауты, (TRH2 является ключевым геном, участвующим в синтезе нейронального серотонина (5-HT)).

Особого упоминания заслуживает применение методики высокоскоростной циклической вольтамметрии (FSCV *in vivo*) для регистрации выделения дофамина у анестезированных животных при стимуляции дофаминэргических входов. Для этого потребовалось вручную изготавливать и калибровать регистрирующие микроэлектроды, что представляло далеко не тривиальную методическую задачу. Правильность стереотаксической постановки регистрирующего электрода проверялась с помощью последующей гистологической верификации.

В качестве стрессорных воздействий автор использовал самые разнообразные процедуры. Применялся как острый кратковременный стресс (процедура неизбежного плавания в тесте Порсолта) так и острый и субхронический иммобилизационный стресс. Были изучены последствия применения так называемого стресса повседневности и стресса социального поражения.

Успешное освоение и применение такого значительного количества методов характеризует автора как высококвалифицированного экспериментатора.

В первой главе изложены результаты исследования вызванного дофаминового ответа с помощью метода вольтамметрии. Был изучен выброс дофамина в зоне прилежащего ядра (AcbC) в ответ на стимуляцию зоны вентральной области покрышки (VTA). Подробно исследована частотная и амплитудная зависимость дофаминового сигнала в зоне NAc при стимуляции зоны VTA с различными характеристиками стимулирующего тока. Проведено сравнение показателей выброса дофамина у мышей и крыс в фоне и под влиянием различных фармакологических веществ. На мышах изучено действие раклоприда - селективного антагониста D2 ауторецепторов и GBR 12909 - селективного ингибитора обратного захвата дофамина. В диссертации показана высокая эффективность метода быстрой сканирующей вольтамметрии (FSCV *in vivo*) для исследования дофаминэргической нейротрансмиссии, дан анализ влияния различных стрессоров на поведение и функционирование дофаминэргической системы.

Глава 2 посвящена анализу нейробиологических основ алкогольного и агрессивного поведения. Исследование потребления сладких растворов крысами нокаутами по гену TRH2 показало, что крысы TRH2 KO достоверно больше пьют раствор сахарозы по сравнению с диким типом. Крысы TRH2 KO оказались более подвержены алкоголизации, в отличие от животных дикого типа, что выражалось в предпочтении спирт-содержащих растворов. В результате действия однократного стресса у животных TRH2 (KO) наблюдалось увеличение потребления спиртового раствора. В работе по исследованию нокауты (у которых более, чем на 80% снижена серотонинэргическая нейротрансмиссия в мозге), показано, что стресс может провоцировать алкогольное потребление у всех крыс, в особенности у животных TRH2 нокауты. В работе изучены особенности агрессивного поведения крыс TRH2 нокауты. В парадигме теста стресса социального поражения крысы нокауты по гену TRH2

выступающие в качестве интродуров вели себя намного агрессивнее, чем крысы дикого типа (WT).

Один из самых важных разделов исследования посвящен изучению последствий однократного стресса социального поражения с помощью метода вольтамметрии и поведенческих методик (глава 3). Было показано, что даже однократное стрессирование способно приводить к определенным изменениям поведения (усиление депрессивно-подобного поведения в тесте Порсолта). При этом у крыс, подвергнутых стрессу наблюдается увеличение вызванного дофаминового ответа в НАс, и снижение эффективности антагониста D2 рецепторов раклоприда. Аналогичное исследование влияния однократного стресса социального поражения на дофаминэргическую нейротрансмиссию и поведенческую активность было выполнено на самках. В данном исследовании выявили определенные отличия в реагировании на стрессорную ситуацию у крыс с активной и пассивной стратегией поведения. У «пассивных», но не «активных» крыс наблюдалось более сильное истощение и более медленное восстановление дофамина.

Интересные результаты получены в исследовании действия антидепрессанта бупропиона, где было показано что бупропион, вводимый на протяжении 10 дней после месячного хронического умеренного неконтролируемого стресса, оказал выраженное антидепрессивное действие (снижение времени неподвижности в тесте Порсолта) только на животных с активной стратегией поведения.

Автором предложена новая модель хронического стресса – содержание животных вместе с крысами, подвергнутыми вызванному острым отравлением фосфорорганическими соединениями. К сожалению, методика изложена слишком лапидарно. Описание метода следовало бы дать более подробно, сколько животных каждой группы содержалось вместе, как формировались группы, зачем потребовалось создавать две группы с разной дозировкой ФОС. В методике сказано, что животные содержались вместе, но только в заключении говорится, что речь идет о бесконтактном стрессе. Учитывая небольшое количество животных, подвергнутых стрессу (6) делать выводы о пригодности модели было бы преждевременно.

Выводы обоснованы и не вызывают сомнений, однако выводы №1 и №3 сформулированы в настолько общей, неконкретной форме, что их можно было бы исключить безо всякого ущерба.

Вопросы и замечания.

Рисунок 21. Почему скорость передвижения указана в см ?

Стр 108 По поводу результатов теста Порсолта написано: «Однако у животных подвергнутых ССП, наблюдалось достоверное увеличение времени неподвижности в тесте принудительного плавания Порсолта ($0,8 \pm 0,2$ против $0,4 \pm 0,1$; $p = 0,0427$, (рисунок 35 F). Не указана размерность величины, но из рисунка 35.F можно понять, что время неподвижности указано в % от общего времени теста. Поскольку время теста 6 минут, то 0,4% от 360 секунд составляет 1.4 секунды. Как это понимать?

В 3-й главе ни разу не упомянуто к крысам каких линий относятся результаты. Если вернуться к разделу методов, становится понятно, что в экспериментах по воздействию стресса социальных поражений использовали половозрелых самцов Sprague-Dawley в качестве «интродеров», которых ссаживали в клетку к более крупному и агрессивному «резиденту» Лонг Эванс. Однако на стр.118 совершенно неожиданно читаем «Сравнительно низкая агрессивность самок ТРН2 КО (по сравнению с самцами ТРН2 КО) во время ССП дала возможность исследователем разделить животных на соответствующие группы (активные и пассивные)». На стр.123 снова читаем «Самки ТРН2 КО-резиденты демонстрировали высокий уровень агрессии по отношению к самкам- интродерам,» Вопрос – на каких животных проводились эксперименты, описанные в 3-й главе?

Стр. 125 Таблица 3. «Побежки», в тесте ПКЛ, %». Что это за показатель? Как считался? На той же странице читаем: «Показана отрицательная достоверная (Таблица 3) корреляция между временем неподвижности в тесте Порсолта крыс Вистар и такими элементами как:.....,побежки в тесте ПКЛ ($R = - 0,4847$Другие показатели в тесте ПКЛ, такие как:....., побежки,.....достоверной корреляции со временем неподвижности в тесте Порсолта – не выявили». Как это понимать?

Стр.132. таблица 8. Еще один непонятный показатель – «ПКЛ, Длительность стойки, %».

Стр.134. «снижение болевого порога под действием 5-ти дневного иммобилизационного стресса, что мы можем видеть в тесте «горячая пластинка», установленного на отметку 20 °C,». Что такое тест, установленный на 20°C?

Стр.141. рис.55. Данные по ПКТ, время в закрытых рукавах указано в %. Что это за проценты (от чего?) и почему исходное значение до стресса равно 130%?

К сожалению, в работе попадаются орфографические и стилистические ошибки, иногда существенно искажающие мысль автора:

- «По их гипотезе, так как префронтальная кора (ПФК) отвечает за контроль агрессии и импульсивности, через СЕР и ДА иннервацию.» 23 стр.
- Цилиндрическую стеклянную емкость (диаметром 45х28 см,) стр.63
- Стр.85 Таблица 1. Зависимость массы животного от глубины опускания электродов.
- Стр. 88 «является выраженная гиперлокомотория [271] являющаяся причиной практически полного отсутствия обратного захвата ДА у животных ДАТ нокауты»

Замечания по оформлению результатов в диссертации не снижают в целом высокую оценку работы, ее актуальности, значимости и новизне полученных данных. Материалы диссертации прошли широкую апробацию. По теме диссертации опубликовано 9 статей, их них - 5 в журналах индексируемых в Scopus и WoS, причем две статьи – в журнале из Q1. Материалы диссертации докладывались на 8-ми международных конференциях.

Закключение.

С учетом всего вышесказанного полагаю:

Содержание диссертации Немеца Всеволода Владимировича на тему: «Изучение дофаминергического компонента стресс индуцированных поведенческих адаптаций» соответствует специальности 1.5.5. Физиология человека и животных.

Диссертационная работа Немеца Всеволода Владимировича представляет собой законченное научное исследование, выполненное на актуальную тему, полученные результаты имеют большое теоретическое и практическое значение.

Нарушений пунктов 9, 11 Порядка присуждения Санкт-Петербургским государственным университетом ученой степени кандидата наук соискателем ученой степени мною не установлено.

Диссертация Немеца Всеволода Владимировича на тему: «Изучение дофаминергического компонента стресс индуцированных поведенческих адаптаций» соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, установленным приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете» и рекомендована к защите в СПбГУ. Соискатель Немец Всеволод Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.5. Физиология человека и животных.

Председатель диссертационного совета

д. биол. наук, профессор,

заведующий кафедрой высшей нервной деятельности

и психофизиологии СПбГУ



Александров А.А.

Дата 11.05.25