

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Борисовой Марии Александровны

«Особенности поведения самцов мышей на моделях хронического колита»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по

специальности 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки) в

диссертационный совет 24.1.239.03 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН»

Актуальность исследования

Диссертационная работа Борисовой Марии Александровны посвящена актуальной проблеме, связанной с механизмами влияния воспалительных заболеваний кишечника на функцию нервной системы. Действительно, патологии желудочно-кишечного тракта вызывают целый ряд сопутствующих патологий, коморбидных психических расстройств, таких как тревога, депрессия, нарушения социального взаимодействия, развитие которых напрямую зависит от состояния микробиоты. Действительно, все больше данных в литературе указывает на то, что микробное сообщество и разнообразные метаболиты, продуцируемые бактериями, влияют на иммунитет, регулируют проницаемость кишечного эпителия, регулируют энергетический метаболизм энтероцитов, функцию афферентных и эфферентных волокон блуждающего нерва, и даже целостность гематоэнцефалического барьера. При этом любое нарушение состояния микробиоты, в том числе связанное с воспалением, будет приводить к патологиям как в кишечнике, так и на уровне целого организма, влияя и на поведенческие паттерны. Поэтому данное исследование несомненно является актуальным и проведено в рамках активно развивающегося направления – выяснения механизмов взаимодействия в системе микробиота-кишечник –мозг.

Научная новизна и значимость работы

Новизна диссертационной работы Борисовой М.А. не вызывает сомнения, впервые изучены две модели колита (генетическая — *Muc2*^{-/-} и химически индуцированная — DSS), что позволяет разделить влияние врожденного дефекта барьерной функции и приобретенного воспаления. Установлено, что у мышей *Muc2*^{-/-} происходит снижение тревожности и увеличивается время социальной активности и доли животных, демонстрирующих садки на самца-интродера. При этом у самцов с химически-

индуцированным воспалением впервые показано нарушение в идентификации запаха самки при сохранении нормальных социальных взаимодействий. Впервые выявлены биохимические особенности содержания ключевых нейромедиаторов и предшественников нейромедиаторов в плазме и мозге, а также охарактеризована активность нейронов вентромедиального гипоталамуса (c-Fos) на моделях хронического воспаления.

Впервые обнаружены изменения микробиоты, которые могут быть ассоциированы с наблюдаемыми изменениями социального поведения, а именно, повышение уровня *Akkermansia muciniphila* у мышей *Muc2*^{-/-} и снижение уровня триптофан-продуцирующих бактерий *E. coli* и *Bifidobacterium* у мышей с DSS-индуцированным колитом. Также выявлена ключевая роль моносахарида L-фукозы как модулятора микробиоты, способного восстанавливать предпочтение запаха самки через повышение уровня триптофана и нормализацию популяции *E. coli*.

Работа обладает высокой теоретической и практической значимостью. Впервые установлены корреляции между изменением определенных видов бактерий и биохимическими изменениями в мозге и плазме, что способствует дальнейшему исследованию новых молекулярных мишеней для воздействия при нарушениях взаимодействия «кишечник-мозг». Практически значимыми являются и результаты, которые обосновывают применение фукозы как потенциального пребиотического агента для коррекции поведенческих нарушений при воспалительных заболеваниях кишечника. Новые теоретические положения могут быть использованы в образовательном процессе при обучении студентов биологических и медицинских специальностей.

Степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций диссертации.

Достоверность полученных Марией Александровной данных не вызывает сомнения. Объекты и методы исследования выбраны корректно. Достаточный объем выборки и проведенных экспериментов свидетельствует об объективности и достоверности полученных результатов. Результаты получены с использованием различных методических подходов, дополняющих друг друга, что обеспечило формирование целостной картины о механизмах нарушения социального поведения мышей, ассоциированных с хроническим колитом различного происхождения и опосредованных изменением состава кишечной микробиоты. Результаты работы являются достоверными и хорошо обоснованными. По результатам исследований сформулировано 7 выводов, которые полностью отражают суть работы. Каждый вывод подкреплён экспериментальными данными и соответствует задачам. На защиту вынесено 3

теоретических положения, обобщающих ключевые новые результаты работы. Автореферат дает достаточно полное представление о диссертационной работе и оформлен надлежащим образом.

Степень достоверности и апробация результатов работы.

Достоверность полученных автором результатов экспериментальной работы подтверждается их воспроизводимостью, адекватностью применяемых методов и методик, соответствующими методами статистической обработки, применением сертифицированного оборудования и реактивов. По материалам диссертации опубликовано 14 работ в рецензируемых изданиях, из них 7 статей (WoS, Scopus) и 7 тезисов конференций, результаты широко представлены на Российских и международных конференциях.

Личное участие автора в получении изложенных результатов.

Личный вклад автора является определяющим при выполнении экспериментальных работ, анализе и обсуждении полученных результатов. Автор самостоятельно выполнял работы по моделированию химически-индуцированного колита, оценке проницаемости кишечника и гематоэнцефалического барьера. Автор осуществлял гистологические исследования, а также участвовал во всех этапах экспериментальных работ, выполняемых совместно с коллегами в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН, в Центре коллективного пользования «Масс-спектрометрические исследования» Международного томографического центра (МТЦ) СО РАН, в Центре микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН, в Центре коллективного пользования «Молекулярная и клеточная биология» Института молекулярной и клеточной биологии (ИМКБ) СО РАН. Автор осуществлял анализ и статистическую обработку полученных данных, участвовал в написании статей и представлении результатов на международных и Российских конференциях.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности, сведения о полноте публикаций.

Диссертационная работа Борисовой М.А. изложена на 150 страницах, хорошо иллюстрирована (25 рисунков) и построена по классическому плану - состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Resultados, Обсуждения результатов, Заключение и Выводов. Во введении указана актуальность исследования, обоснованы и четко поставлены цель и задачи работы, приведены положения, выносимые на защиту, научная новизна и теоретическая и практическая значимость. Обзор литературы изложен на 22 страницах и включает несколько разделов. В первом разделе автор описывает распространенность и патогенез воспалительных заболеваний кишечника, которые включают как генетические аспекты, дисрегуляцию иммунных процессов, так и нарушение микробиоты, обсуждает механизмы увеличения проницаемости кишечника, а также дает обзор современных подходов к лечению. Второй раздел посвящен изменениям периферической и центральной нервной системы при воспалительных заболеваниях кишечника. Представлены данные о развитии периферических нейропатий, а также неврологических и психических расстройств таких как депрессии, тревожности, биполярного расстройства, расстройств пищевого поведения, а также болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера, которые возникают не только как побочный эффект хронического заболевания, но и как внекишечное проявление воспалительной реакции. Третий раздел посвящен описанию нейрогуморальных механизмов связи головного мозга и пищеварительной системы, где рассматриваются роли иммунной системы, метаболитов микробиоты, энтеральной нервной системы и блуждающего нерва. Подтверждением роли микробиоты в развитии и функционировании нервной системы являются GF-животные, полностью свободные от микробов, и характеризующиеся нарушениями в развитии и усилением реакции на стресс. Четвертая глава описывает модели воспалительных заболеваний кишечника, включающие как генетические связанные с нокаутом интерлейкинов, химические индуцированные, и особо рассмотрена модель мышей с нокаутом в гене, кодирующем кишечный муцин-2 (линия *Muc2^{-/-}*), используемая в данной работе. В конце обзора литературы имеется заключение, где автор обобщает современные представления о роли воспалительных заболеваний кишечника в нарушении функций центральной нервной системы и указывает на актуальность дальнейших исследований связи между кишечником и мозгом. Библиографический указатель включает 314 источников литературы.

Хочется отметить широкий спектр использованных М.А. Борисовой методических подходов, которые современны и адекватны решению поставленных задач. В работе использован широкий спектр современных методов: моделирование хронического колита, поведенческое тестирование, иммуногистохимический анализ, измерение проницаемости

кишечного и гематоэнцефалического барьера, анализ кишечного микробиома, ЯМР-спектроскопия метаболитов в крови и в головном мозге. Автор подробно и тщательно описывает используемые методы и подходы. Отдельно представлены порядок проведения тестов и экспериментальных процедур для каждой модели с указанием количества используемых животных.

Глава «Результаты» состоит из трех разделов, где последовательно и подробно описаны особенности поведения самцов мышей с генетически обусловленной и химически-индуцированной формами колита. В каждом разделе представлены описание физического состояния животных и гистологические картины, отражающие состояние толстой кишки, данные об особенностях поведения, в том числе социального, у мышей каждой группы, а также данные о проницаемости кишечного барьера, выявлены особенности микробиоты в каждой модели, а также ключевые метаболиты, изменение концентраций которых является следствием хронического воспаления и/или изменения микробиоты. Особый интерес представляют данные об активации нейронов в вентромедиальном ядре гипоталамуса в ответ на предъявление социально значимого стимула по количеству c-Fos-позитивных ядер, где выраженность окрашивания была больше у мутантных самцов после взаимодействия с самцом-интродером, что является дополнительным доказательством изменения нейрональных процессов в исследуемой модели. В модели химически-индуцированного колита использовали фукозу – концевой моносахарид муцина-2 – для модуляции состояния слизистой кишечника. Фукоза не оказала значительного влияния на развитие воспалительного процесса в кишечнике, однако, восстанавливала запаховое предпочтение самок у мышей с колитом. Далее с помощью метаболомного анализа было выявлено снижение уровня триптофана в плазме мышей с химически-индуцированным колитом, что согласуется с данными об уменьшении числа триптофан-продуцирующих *E. coli*.

Роль триптофана и серотонина в реализации феномена запахового предпочтения была подтверждена как инъекцией предшественника серотонина (5-гидрокситриптофана) модельным мышам, так и при использовании антибиотика рифампицина, направленного на *E. coli*.

В третьей части результатов был проведен анализ социальных взаимодействий самцов C57BL/6 в тесте с двумя интродерами с целью описать предполагаемый механизм нарушений полового и агрессивного поведения в моделях хронического колита.

В главе «Обсуждение результатов» автором подробно рассмотрены и обсуждены полученные результаты с привлечением литературных данных. Подробно раскрыты возможные механизмы реализации влияния хронического воспаления на

функционирование центральной нервной системы и, особенно, роли глицина и серотонина в реализации поведенческих паттернов при этих патологиях. Приведена таблица сравнения двух моделей колита, которая наглядно демонстрирует различия микробиоты, профиля метаболитов, особенностей поведения.

Диссертация завершается разделом «Заключение» и выводами, полностью соответствующими поставленным задачам исследования.

Вопросы и замечания

1. В первой части исследования автор анализирует линию мышей *Muc2*^{-/-}. Для данного типа экспериментов контролем служат как мыши дикого типа (*Muc2*^{+/+}), так и мыши линии C57BL/6. Однако, не во всех сериях показаны результаты трех групп животных. Так уровень воспаления и морфологии показан для трех групп животных - *Muc2*^{-/-}, *Muc2*^{+/+} и C57BL/6, однако, проницаемость ГЭБ и параметры плотных контактов не показаны для животных дикого типа. Поведение в домашней клетке, тест с одним интродером также не показаны для животных дикого типа. С чем это связано?
2. Почему для межгрупповых сравнений (трех групп животных) не использовался дисперсионный анализ (ANOVA или его аналог для непараметрических данных)?
3. Активность ядер ВМГ была оценена исключительно по окрашиванию на белок c-fos (рис 13 В). Почему отсутствует группа *Muc2*^{+/+}? Насколько специфично это окрашивание для нейронов (возможно активации глии), не указано, сколько животных было использовано в эксперименте, на оригинальном рисунке не указан масштаб? Насколько эти результаты позволяют однозначно утверждать об активации нейронов этого отдела мозга?
4. В результате метагеномного анализа была выбрана *Akkermansia*, хотя по рис 15 А – видно изменения и других родов (напр. *Alloprevotella* – снижение, *Escherichia-Shigella* – снижение, *Prevotellaceae* – повышение). При этом в обсуждении говорится, что увеличение содержания этой бактерии в кишечнике животных при нокауте в гене, кодирующем муцин-2, является парадоксальным, учитывая природу этой мутации. Почему увеличение произошло и у животных дикого типа?
Может ли нокаут гена, кодирующего муцин-2, затрагивать другие системы кроме пищеварительной и также влиять на экспрессию других генов, в том числе в нервной системе?

5. В обсуждении роли глицина автор приводит описание работ, где роль глицина исследовали с помощью ингибирования глициновых рецепторов (GlyR) и глицин-связывающих сайтов на NMDA-рецепторах. Непонятно, эти работы были проведены в данной диссертационной работе? С чем может быть связано увеличение бетаина и холина крови?
6. Насколько корректно утверждение, сделанное только по результатам метаболомного анализа (в обсуждении): можно предположить, что глицин является главным регулятором оси «микробиота – кишечник – мозг» на модели колита с дефицитом муцина-2, ведь фактически дефицит муцина-2 в данном феномене на сыграл определяющей роли?
7. Важным результатом анализа модели химически-индуцированного колита явилось изменение уровня триптофана. Каким образом уровень триптофана в плазме может вызывать восстановление обонятельной функции – на периферии или в отделах мозга, отвечающих за восприятие и предпочтение запаха самки?

Указанные комментарии и вопросы не носят принципиального характера и не снижают научно-практическую значимость выполненной автором работы.

Заключение

Диссертационная работа Борисовой М.А. «Особенности поведения самцов мышей на моделях хронического колита» представляет собой завершенное, научно обоснованное исследование, вносящее существенный вклад в раскрытие механизмов работы оси «микробиота – кишечник – мозг» и расширяющее представления о роли микробиоты и ее метаболитов в регуляции социального поведения. Работа выполнена на высоком научном уровне. Автором получены результаты высокой степени достоверности и новизны. Выводы диссертации подтверждены полученными данными.

Работа полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства России от 24 сентября 2013 года №842 (в текущей редакции), предъявляемым к диссертациям на

соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Борисова Мария Александровна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки).

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой физиологии человека и животных

Института фундаментальной медицины и биологии

Федерального государственного автономного

образовательного учреждения высшего образования

«Казанский (Приволжский) федеральный университет»,

профессор, д.б.н.,



Ситдикова Гузель Фаритовна

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Почтовый индекс: 420008

Адрес: Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18

Сайт университета: <https://kpfu.ru/>

E-mail университета: public.mail@kpfu.ru

E-mail оппонента: Guzel.Sitdikova@kpfu.ru

Личную подпись Ситдиковой Г.Ф. заверяю

