

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Тихоновой Марии Александровны 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

Диссертационное исследование М.А. Борисовой посвящено изучению механизмов регуляции поведения через ось микробиота-кишечник-мозг на моделях воспаления кишечника у мышей. Связь между микробиотой и работой головного мозга показана на лабораторных животных и у человека. Модуляция микробиоты влияет на уровень тревожности, эмоциональное и социальное поведение, выраженность ответа на стресс. Среди неврологических и психических расстройств, коморбидных воспалительным заболеваниям кишечника, отмечены повышенный риск возникновения депрессии, тревожности, биполярного расстройства, расстройств пищевого поведения (анорексия, булимия), а также болезни Паркинсона. Изучение механизмов и путей регуляции оси микробиота – кишечник – мозг не только представляет интерес для описания причин изменений поведения, но и позволит предложить новые пути для терапии заболеваний ЦНС, связанных с нарушениями кишечной микробиоты и воспалительными заболеваниями кишечника. Молекулярно-генетические механизмы регуляции поведения через ось микробиота-кишечник-мозг в целом и социального поведения в частности до конца еще не установлены, и данное исследование вносит свой вклад в его решение. Таким образом, работа имеет несомненную актуальность и фундаментальную направленность.

Научная новизна и значимость работы

Диссертационное исследование Борисовой М.А. отличается научной новизной, открывая ранее неизвестные аспекты регуляции социального поведения животных через ось микробиота-кишечник-мозг. В работе обнаружены особенности изменения поведенческих паттернов у самцов мышей при взаимодействии с самцами и самками, которые ассоциированы с хроническим воспалением кишечника и изменением состава микробиоты. Для модели хронического воспаления, генетически обусловленного дефицитом белка муцин-2, впервые показано снижение тревожности и стереотипного поведения, увеличение продолжительности социальных контактов с самцом и доли животных, демонстрирующих садки на самца-интродера. Показано, что особенности социального поведения у самцов мышей Muc2-/- сопровождаются изменениями в характере активации нейронов

вентромедиального гипоталамуса после предоставления социального стимула. Для модели химически-индуцированного хронического воспаления, вызванного предоставлением в питье натриевой соли сульфата декстрана (DSS), впервые показано отсутствие предпочтения самцами запаха самки при отсутствии нарушений социального взаимодействия с самкой- и самцом-интродером. Для самцов мышей с генетически обусловленным дефицитом белка муцин-2 (линии Muc2-/-) показано нарушение целостности кишечного и гематоэнцефалического барьеров в сравнении с контрольной линией C57BL/6. Показано увеличение уровня глицина в головном мозге у самцов мышей Muc2-/- и снижение уровня триптофана в крови мышей на модели DSS-индуцированного колита. Особенности поведения самцов мышей Muc2-/-, в том числе, социального поведения ассоциированы с повышением уровня *Akkermansia muciniphila* в кишечной микробиоте, в то время как на модели DSS-индуцированного колита сдвиги предпочтений социально-значимых запахов у самцов мышей ассоциированы со снижением уровня триптофан-продуцирующих бактерий *E. coli* и *Bifidobacterium*. Показано, что моносахарид L-фукоза при предоставлении в питье изменяет состав микробиоты кишечника и восстанавливает предпочтение запаха самок самцами мышей на фоне DSS-индуцированного колита.

Работа имеет значение для фундаментальной науки в области нейрофизиологии. Борисовой М.А. сформулированы выводы и положения, которые вносят существенный вклад в представления о механизмах регуляции и модуляции поведения. Эти результаты расширяет представления о функционировании оси микробиота – кишечник – мозг и ее влиянии на социальное поведение. Используемый в работе в качестве потенциального пробиотика моносахарид L-фукоза может быть предложен как инструмент для разработки методов коррекции поведенческих нарушений у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника. Теоретические положения исследования могут быть использованы в курсах лекций и учебных пособиях для студентов биологических и медицинских факультетов ВУЗов.

Содержание и оформление диссертации

Диссертационная работа М.А. Борисовой построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы и приложения, где в табличном виде перечислены последовательности праймерных олигонуклеотидов, использованных в работе. Диссертация изложена на 150 страницах, содержит 25 рисунков, 8 таблиц и 1 приложение.

Введение включает исчерпывающие сведения актуальности выполняемой работы, показана степень научной разработанности проблемы, определена цель и сформулированы логически выстроенные задачи исследования, определена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы достаточно полно суммированы данные литературы по теме исследования. Глава включает четыре раздела и заключение. Обзор литературы содержит детальную характеристику воспалительных заболеваний кишечника, сопутствующих изменений поведения и нарушений в ЦНС, описаны модельные объекты, используемые в исследованиях воспалительных заболеваний кишечника, с подробным представлением 2 моделей, генетической и химически индуцированной, которые использовали в работе. Большой интерес представляет раздел, в котором проанализированы нейрогуморальные механизмы связи головного мозга и пищеварительной системы. К недочетам следует отнести игнорирование русскоязычных источников – в списке литературы присутствуют только 2 ссылки на русскоязычные статьи (из 314), 1 из которых самоцитирование, при наличии большого количества публикаций по теме в открытой базе данных elibrary.

Во второй главе автором представлены материалы и методы. Работа выполнена на 2 моделях колита у мышей, обусловленного дефицитом белка муцин-2 (самцы линии Muc2^{-/-}, в качестве контроля использовали их однопометников без мутации (Muc2^{+/+}) и самцов контрольной линии C57BL/6) или химически индуцированного предоставлением в питье натриевой соли сульфата декстрана (DSS). Для модуляции состава кишечной микробиоты и функционирования оси микробиота-кишечник-мозг на модели DSS применяли пробиотик L-фукозу, антибиотик рифампицин, 5-гидрокситриптофан. Проведено поведенческое фенотипирование животных в тестах «открытое поле», «темно-светлая камера», закапывания шариков, на предпочтение социально значимого запаха, ольфакторный тест на распознавание запахов, контактный тест в домашней клетке резидент-интродер, а также тестирования поведения в домашней клетке.

В качестве методов лабораторного исследования автором использованы: измерение проницаемости барьера кишечника и гематоэнцефалического барьера, гистологический анализ ткани кишечника, иммуногистохимический анализ. Также приведены описания методов, с помощью которых была получена часть результатов, включенных в работу, но которые выполнены без непосредственного участия соискателя: просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), измерение уровня экспрессии генов, измерение уровня содержания отдельных таксонов бактерий, метагеномный анализ кишечного микробиома, ЯМР-спектроскопия метаболитов в крови и в головном мозге. Статистический анализ результатов выполнен с использованием t-теста (критерий Стьюдента), дисперсионного анализа, критерия Краскела-Уоллеса (Kruskal-Wallis ANOVA), U-критерия Манна-Уитни, критерий Уилкоксона, критерия χ^2 , точного теста Фишера. Для анализа результатов теста с двумя интродерами использовали метод главных компонент. Для контроля ошибки первого рода при проведении множественных сравнений использовали поправку Бенджамини-Хохберга.

Третья глава диссертации посвящена описанию собственных результатов исследования, четвертая глава анализирует и интерпретирует полученные результаты в свете имеющихся литературных данных.

Финальная часть работы включает в себя разделы «Заключение» с кратким резюме результатов, полученных автором, и «Выводы». Выводы основаны на интерпретации полученных данных, соответствуют цели научного исследования, а также подтверждают положения, выносимые на защиту. Список литературы включает 314 источников, в т.ч. 2 русскоязычных.

Таким образом, диссертационная работа выполнена и оформлена согласно требованиям, предъявляемым к диссертационным работам. Автореферат соответствует тексту диссертации, публикации автора полно отражают основное содержание работы.

Достоверность и обоснованность научных результатов

Достоверность полученных результатов основана на достаточном по объему и репрезентативности экспериментальном материале, обеспечена соответствующим дизайном исследования, обоснованном формировании групп сравнения, использованием валидных моделей, грамотным использованием современных методов исследования. В работе применены адекватные методы статистической обработки. Сделанные автором выводы обоснованы и соответствуют поставленным задачам. Выводы и выносимые на защиту положения основаны на полученных результатах. Новизна результатов, основных положений и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывают сомнений.

Материалы диссертационного исследования в необходимом объеме представлены в публикациях. Результаты, полученные в ходе работы, опубликованы в 7 статьях из перечня журналов, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук по искомой специальности, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, РИНЦ. Кроме того, автор представил основные результаты и положения диссертационного исследования на профильных российских и международных конференциях. Результаты диссертационного исследования соответствуют пп. 4, 7 и 8 паспорта специальности 1.5.5. – физиология человека и животных.

Общие вопросы и замечания

1) В работе исследуется важный вопрос нейрофизиологии, а именно - регуляции поведения животных через модуляцию оси микробиота-кишечник-мозг. При этом в работе (как в литературном обзоре, так и в экспериментальной части) значимый акцент сделан на патологические воспалительные процессы в кишечнике. Механизмам в ЦНС, обуславливающим наблюдаемые изменения поведения, уделено меньше внимания. Экспериментально показаны повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера, повышение содержание глицина в головном

мозге методом ЯМР спектроскопии, усиление активации нейронов вентромедиального гипоталамуса при контакте с самцом на генетической модели; на фармакологической модели центральные механизмы остаются вообще за скобками работы.

2) В диссертацию включен большой экспериментальный материал, полученный на 2 моделях, заявлено исследование многими методами, включая исследование экспрессии генов, ЯМР, электронную микроскопию, метагеномный анализ, к освоению которых и выполнению исследования с помощью которых соискатель не имеет непосредственного отношения. Для квалификационной работы это не кажется обоснованным, поскольку вызывает много дополнительных вопросов и затрудняет квалификационную оценку.

В частности, возникают вопросы по дизайну экспериментов на двух моделях:

- Чем объясняются различия дизайна экспериментов для генетической и фармакологической модели, выбор разных показателей для изучения механизмов? Почему в рамках фармакологической модели не исследовали ни один показатель, связанный с ЦНС, а уровни экспрессии генов цитокинов определяли в кишечнике, но не в мозге или хотя бы цитокиновый профиль в крови? Почему для ряда показателей в экспериментах с генетической моделью идет сравнение только с группой линии C57BL/6, а не с *Muc2*^{+/+}?
- Корреляционный анализ между показателями поведения и проницаемости гематоэнцефалического барьера, количеством активированных клеток в вентромедиальном гипоталамусе, содержанием глицина в мозге усилил бы выводы о вовлечении этих механизмов в регуляцию поведения мышей с нокаутом по гену *Muc2*.

Также описание некоторых методов требует уточнения:

- В каком возрасте мышей C57BL/6 начинали эксперименты с моделированием хронического и острого воспаления путем поения DSS?
- Чем обусловлен выбор сокращения срока «получения полового опыта» путем ссаживания с самкой у мышей в экспериментах с моделированием воспаления до 7-14 дней в сравнении с экспериментом на самцах мышей C57BL/6, в котором изучали взаимное соответствие реакций на самца и самку в контактном и запаховом тестах и период «получения полового опыта» составил 21-25 дней? Каким образом подтверждали получение полового опыта – отслеживали ли вагинальные пробки, беременность самок? В описании контактного теста написано, что использовали самку в эструсе – был ли эструс естественным или индуцированным, каким образом подтверждали наличие эструса?
- Сколько срезов и полей зрения обсчитывали для количественной оценки показателей в рамках гистологического анализа и иммуногистохимического анализа на кладин-3?
- Чем обоснован выбор дозы, режима и длительности введения рифампицина?

3) Интерпретация теста резидент-интродер вызывает вопросы. При описании теста в Методах вообще идет ссылка на обзорную работу Katsandegwaza et al., Int J Mol Sci., 2022, Inflammatory Bowel Disease: A Review

of Pre-Clinical Murine Models of Human Disease, которая посвящена моделям воспалительных заболеваний кишечника на мышах, тест резидент-интродер там вообще не упоминается. Этот тест используют для оценки межсамцовой территориальной агрессии. Тестирование социального взаимодействия у самцов мышей проводят на нейтральной территории (не в домашней клетке тестируемого самца) и в качестве партнера предлагают ювенильного, а не половозрелого самца. Трактовка теста с двумя интродерами как предпочтение самца или самки также вызывает сомнения, поскольку идет наложение процессов, обусловленных территориальной межсамцовой агрессией, с одной стороны, и половой мотивацией, с другой. Для оценки предпочтения используют бесконтактный тест в трехотсечной камере с перегородками, либо на нейтральной территории с отгороженными отсеками, куда помещают партнеров тестируемого животного.

4) Я не нашла в диссертации результатов, опубликованных в статье Литвинова Е.А. и др., Вавиловский журнал генетики и селекции, 2018, ее следует исключить из списка публикаций по теме диссертации.

5) В порядке научной дискуссии предлагаю следующие вопросы.

- В Обзоре литературы соискатель пишет: «Кишечная микробиота ребенка начинает формироваться с рождения. К возрасту одного года формируется бактериальный профиль, характерный для взрослого организма. ... микробиом возвращается к состоянию, которое установилось в раннем детстве». По литературным данным и результатам исследований группы Кожевниковой Е.Н., что можно сказать о сроках формирования кишечного микробиома у мышей в норме и при генетически обусловленном дефиците белка муцин-2?

- Ряд антибиотиков, включая использованный в диссертации рифампицин, обладают нейро/психотропной активностью помимо модуляции микробиоты. Как Вы считаете, возможно ли и каким образом определить вклад воздействия антибиотика через микробиоту в его нейротропную активность *in vivo*, если антибиотик проходит через гематоэнцефалический барьер и напрямую воздействует на клетки мозга?

Вышеизложенные замечания и вопросы не являются существенными и не снижают значимости проведенного исследования. Принципиальных замечаний к содержанию и оформлению диссертационной работы нет.

Заключение

Диссертационная работа Борисовой М.А. «Особенности поведения самцов мышей на моделях хронического колита» является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, направленной на решение научной задачи определения механизмов регуляции поведения через ось микробиота-кишечник-мозг на моделях воспаления кишечника у мышей, которая имеет существенное значение для нейрофизиологии.

По актуальности, научной новизне, методическому уровню, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте изложения материалов работы в печатных

изданиях диссертационная 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:

Главный научный сотрудник

И.о. зав. лабораторией экспериментальной нейронауки

Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»,

д.б.н.

Тихонова Мария Александровна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» (НИИНМ),

Почтовый индекс: 630117

Адрес: г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4

Сайт: <https://neuronm.ru/>

E-mail НИИНМ: inm@neuronm.ru

E-mail оппонента: tikhonovama@neuronm.ru

Личную подпись Тихоновой М.А. заверяю



Начальник
отдела кадров

05.06.2026