

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К.

Анохина» РАН

Чл. корр. РАН, профессор

С.К.Судаков

« »

2014 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертации Малышева Антона Викторовича «Экспериментальное моделирование расстройств аутического спектра и депрессии; поиск путей пептидергической коррекции», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность исследования. Диссертация А.В.Малышева посвящена поиску путей пептидергической коррекции расстройств аутического спектра и депрессии. Актуальность исследования обусловлена в первую очередь возрастающей частотой встречаемости патологий этого рода и тяжестью их последствий. Несмотря на интенсивные медицинские исследования, этиология и патогенез аутизма и депрессии окончательно не выяснены, в том числе – в силу ограниченности исследований, проводимых на человеке. Именно поэтому разработка и верификация экспериментальных моделей на лабораторных животных критически необходима и актуальна, как и тестирование способов коррекции экспериментально вызванных патологий. Вторым фактором, обуславливающим актуальность исследования А.В.Малышева, является тестирование корректирующих свойств пептидов - высокоспецифичных биорегуляторов, обладающих минимальными побочными эффектами. Таким образом, работа А.В.Малышева прямо адресуется к актуальным медицинским и социальным проблемам.

Научная новизна исследования. В работе А.В.Малышева проведено сравнительное исследование трех форм патологий – фетального вальпроатного синдрома (ФВС) и депрессивноподобных состояний, вызванных либо генетически обусловленными факторами, либо хронической блокадой дофаминовых рецепторов. На основании проведенных А.В.Малышевым исследований впервые показана возможность коррекции

проявлений фетального вальпроатного синдрома регуляторными пептидами различных групп (фрагмент АКТГ Семакс, опиоидный пептид бета-казоморфин, фрагмент агринина-вазопрессина). При этом все исследованные пептиды нормализовали социальные взаимодействия и снижали проявления депрессивноподобных состояний. Кроме того, впервые показана возможность пептидергической коррекции морфологических изменений мозга, связанных с вальпроатным синдромом, а именно восстановление объема гиппокампа до уровня контрольных животных. В работе А.В.Малышева впервые исследованы особенности онтогенеза крыс линии WAG/Rij и показано, что отклонения в их поведении наблюдаются с первого месяца жизни, задолго до проявления эпилепсии, которая считается основной причиной депрессивноподобного состояния. Впервые показана возможность экспериментальной индукции депрессивноподобного состояния у взрослых крыс хроническим введением блокатора дофаминовых D2 рецепторов.

Достоверность и обоснованность результатов исследования. Достоверность полученных результатов основана на использовании комплекса методик, позволяющих достичь цели исследования и достаточного объема выборок в поведенческих экспериментах. Используемые методы охватывают период от первой недели жизни до взрослых половозрелых животных (50 дней), причем для каждого возраста использованы экологически и онтогенетически адекватные методы исследования. В работе применены как стандартные, так и оригинальные методики, позволяющие оценить широкий спектр поведенческих и когнитивных особенностей животных. Обоснованность выносимых на защиту положений и выводов диссертации подтверждается полученными результатами, а их достоверность обеспечивается адекватной статистической обработкой полученных научных данных

Практическая и теоретическая значимость работы. Результаты исследования, выполненного А.В.Малышевым, расширяют методическую базу биомедицинских исследований и развивают представления о нейробиологических основах патологий развития мозга. Параллельное исследование трех форм экспериментальных патологий позволяет сопоставить динамику и симптоматику вызванных ими нарушений, расширяя представление об их возможных механизмах.

Практическая значимость работы обусловлена в первую очередь исследованием корректирующего действия биологически активных пептидов. Полученные положительные результаты показывают возможность нормализации физиологических, когнитивных и социальных показателей у животных с эпигенетически вызванной патологией. При этом каждый из исследованных пептидов обладает собственным

спектром корректирующего действия, что позволило автору предложить возможность их совместного применения для коррекции мозговых дисфункций различного генеза.

Объем и структура работы. Диссертационная работа А.В.Малышева, объемом 173 страницы, построена по традиционному плану и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение» и «Выводы». Работа содержит 28 рисунков и 21 таблицу. Список цитированной литературы включает 204 источника.

Общая характеристика работы. В разделе «Введение» кратко описана проблемная ситуация и существующие подходы к лечению расстройств аутистического спектра (РАС), обоснована актуальность их моделирования и исследования на животных, поставлены цель и задачи работы, а также приведены положения, выносимые на защиту. Раздел «Обзор литературы» содержит сведения о современном состоянии медицинских и биологических исследований, включая этиологию и патогенез РАС и экспериментальные подходы к их моделированию на животных. Отдельные главы посвящены рассмотрению депрессивных заболеваний у человека и их генетически обусловленного моделирования на крысах. В заключительной части обзора описано применение регуляторных пептидов в клинике и эксперименте для коррекции патологий ЦНС.

В разделе «Материалы и методы» приведены данные об экспериментальных сериях, количестве животных в каждой серии, использованных протоколах экспериментов и установках, для части которых приведены схемы, а также о примененных статистических методах.

Раздел «Результаты» содержит последовательное описание серий экспериментов на трех моделях патологий. В подразделах 5.1-5.5 приведены результаты исследования специфики ФВС, начиная с гнездового периода, в тестах на моторику, двигательную активность, проприоцептивную, обонятельную и тактильную чувствительность, а также зависимость от матери поведения, в том числе на фоне введения блокатора дофаминовых рецепторов клеоприта. В более поздних тестах несколькими способами проведена оценка тревожности, социальных взаимодействий, депрессии, болевой чувствительности и способности к обучению с отрицательным подкреплением. В отдельных сериях исследовано действие пептидов Семакса, бета-казоморфина-7 и аналога фрагмента АВП на тестирование ранних и поздних форм поведения. В подразделах 5.6-5.7 приводятся результаты тестирования поведения крыс линии Wag/Rij по той же схеме, которая применялась для животных с ФВС. Кроме того, приведены результаты тестирования когнитивных функций этих крыс в сложном пищевом лабиринте с переучиванием. В подразделе 5.8 описаны результаты тестирования депрессивноподобного состояния у

взрослых крыс, получавших хронические инъекции клеоприда, в тестах на потребление сахарозы, принудительное плавание и пищевую мотивацию (novelty suppressed feeding). Раздел «Обсуждение» построен по такой же схеме, как «Результаты»: в подразделах 6.1-6.2 обобщены и сопоставлены с литературными данными собственные результаты, полученные на животных с ФВС; в разделе 6.3 сведены данные об эффектах пептидов и обсуждены возможные механизмы их действия. Обсуждение содержит обобщающие графики, на которых сведены результаты разных серий экспериментов. Подраздел 6.4 описывает дополнительную серию экспериментов, в которых методом магнитно-резонансной томографии исследовали изменения структуры и объема нескольких областей мозга у взрослых крыс с ФВС. Этот подраздел включает полное описание серии (цель, методы, результаты и обсуждение). В подразделах 6.5-6.7 обобщены результаты исследований поведения у крыс Wag/Rij и проведено сопоставление отклонений в поведении у этих животных с крысами-носителями ФВС. Полученные автором результаты обсуждены в сопоставлении с отечественными и международными современными исследованиями, подробно и на хорошем уровне.

В разделе «Заключение» кратко перечислены основные результаты, полученные автором, и намечены направления будущих исследований и возможного практического применения результатов данной работы.

Выводы диссертации отражают и резюмируют полученные автором экспериментальные результаты, соответствуют поставленным в работе задачам, являются обоснованными и достоверными.

Замечания по диссертации. Ряд замечаний по диссертации относится к описанию примененных методов. Так, автор не указывает, каким образом проводилась регистрация поведения (напр., применялась ли видеорегистрация); по каким параметрам определялись формы поведения (напр., активное и пассивное плавание и иммобилизация). Автор сообщает, что в исследовании ФВС была «адаптирована модель мозговой дисфункции», но не указывает, в чем именно заключались отличия от исходной модели.

В описании серий с крысами линии Wag/Rij для сравнения использованы крысы Wistar. В разделах «Результаты» и «Обсуждение» крысы этих двух линий постоянно называются «опыт» и «контроль» соответственно, что, на мой взгляд, неверно по смыслу. Отсюда проистекают и формулировки типа «у крыс линии WR происходит снижение болевой чувствительности или гипоальгезия» или «данные, полученные в тестах ОП и ПКЛ описывают рост уровня тревожности у крыс линии WAG/Rij». Такие формулировки предполагают динамичный процесс снижения или роста, в то время как имеется в виду просто различие между двумя линиями.

При рассмотрении результатов «детского» поведения возникает ряд вопросов, также связанных с методом оценки поведения. У крыс WR по сравнению с Wistar меньше время контакта с матерью и число подталкиваний; на основании полученных данных сделан вывод, что «у крыс WR относительно животных линии Wistar ... снижена мотивация находиться в контакте с матерью». В то же время, у крыс WR ниже латентный период (ЛП) присасывания (данные о времени сосания в работе не приводятся, и неясно, включает ли «время контакта с матерью» время сосания). В связи с этим возникает предположение, что детеныши WR, возможно, больше времени заняты сосанием, что может быть связано с их меньшим весом, измененным метаболизмом и т.д. К сожалению, данные о динамике роста (веса) детенышей в работе не приводятся.

В раздел «Обсуждение» включены два отдельных фрагмента работы – о действии ВПК на развитие мальков *Danio rerio* и данные МРТ исследования мозга крыс с ФВС и его пептидной коррекцией. Мне представляется, что первый из этих фрагментов не имеет прямого отношения к теме диссертации и мог быть исключен из нее без ущерба для работы. Фрагмент по МРТ, на мой взгляд, вносит существенный вклад в диссертационную работу. При этом возникает вопрос о том, почему эта часть исследования не представлена в «Методах» и «Результатах», а полностью описана в «Обсуждении», а также – почему заключение по этим интересным и ценным данным не вошло в «Выводы».

Представляется спорным высказанное автором предположение о том, что «в основе сходных поведенческих изменений лежат и сходные механизмы». В задачи данной работы не входило исследование механизмов сравниваемых патологий; в общем же виде это положение дискуссионно.

В целом, высказанные замечания не снижают общей положительной оценки работы А.В.Малышева.

Заключение. Диссертация Малышева Антона Викторовича на тему «Экспериментальное моделирование расстройств аутического спектра и депрессии; поиск путей пептидгической коррекции», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора Дубынина Вячеслава Альбертовича, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной задачи – экспериментального моделирования расстройств аутического спектра и депрессии, а также поиска способов их коррекции.

По методическому уровню, новизне и научно-практической значимости полученных результатов диссертация соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от

24.09.2013 г. № 842, предъявляемым диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор – Малышев Антон Викторович заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.03.01 – физиология.

Отзыв подготовлен кандидатом биологических наук А.А.Тиуновой, обсужден и утвержден на совместном заседании лабораторий нейробиологии памяти и системогенеза поведения 27 октября 2014 г., протокол № 7.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории нейробиологии памяти
ФГБУ «Научно-исследовательский
институт нормальной физиологии
имени П.К. Анохина» РАН,
кандидат биологических наук

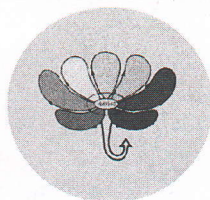
Тиунова

А.А.Тиунова

Подпись Тиуновой А.А. удостоверяю

спец. по картам *Мартышев (А.С. Мартышев)*





**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ НОРМАЛЬНОЙ
ФИЗИОЛОГИИ ИМЕНИ П.К. АНОХИНА»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК**

125315, а/я 72, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8 || Тел.: +7 495 601-22-45 Факс: +7 499 231-00-45 ||
Электронная почта: nphys@nphys.ru || сайт: <http://nphys.ru/>

№

175/2

Дата:

26.09.2019

г. Москва

**Сведения о ведущей организации
по диссертационной работе Малышева Антона Викторовича
на тему «Экспериментальное моделирование расстройств аутистического спектра и
депрессии; поиск путей пептидургической коррекции»
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.03.01 — физиология.**

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина» Российской академии медицинских наук
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	ФГБУ «НИИНФ им. П.К. Анохина» РАМН
Почтовый индекс, адрес организации	125315, ул. Балтийская, д.8, а/я 72 125009, ул. Моховая, д. 11, стр. 4
Веб-сайт	http://nphys.ru/
Телефон	+7 (495) 601-22-45
Адрес электронной почты	nphys@nphys.ru
Список основных публикаций работников структурного подразделения, в котором будет готовиться отзыв, по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	1. Тиунова А.А., Торопова К.А., Коновалова Е.В., Анохин К.В.. Эффекты системного введения ингибиторов гистондеацетилаз на формирование памяти и экспрессию ранних генов в мозге цыплят. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2012, Т.153, № 5, С. 703-707.2. 2. Амельченко Е .М., Зворыкина С.В., Безряднов Д.В., Чехов С.А., Анохин К.В. Возможность репарации памяти: напоминание восстанавливает условнорефлекторное замирание, нарушенное ингибитором синтеза белка у мышей. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова, 2013, 63(2): 227-234.

3. Зоц М.А., Ивашкина О.И., Иванова А.А., Анохин К.В. Формирование пространственной и непространственной памяти в различных версиях краткого обучения в водном лабиринте Морриса у мышей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2013, 156(11): 541-545.
4. Strekalova T., Anthony D.C., Dolgov O., Anokhin K., Kubatiev A., Steinbusch H.M., Schroeter C. The differential effects of chronic imipramine or citalopram administration on physiological and behavioral outcomes in naïve mice. Behav Brain Res., 2013, 245: 101-106
5. Cline B.H., Anthony D.C., Lysko A., Dolgov O., Anokhin K., Schroeter C., Malin D., Kubatiev A., Steinbusch H.W., Lesch K., Strekalova T. Lasting downregulation of the lipid peroxidation enzymes in the prefrontal cortex of mice susceptible to stress-induced anhedonia. Behavioural Brain Research, 2014: 1-12
6. Andreev-Andrievskiy A., Popova A., Boyle R., Jeffrey Alberts, Boris Shenkman, Olga Vinogradova, Dolgov O., Anokhin K., Tsvirkun D., Soldatov P., Nemirovskaya T., Ilyin E., Sychev V. . Mice in Bion-M 1 Space Mission: Training and Selection. PLoS ONE 9(8): e104830. doi:10.1371/journal.pone.0104830 (Citation: Andreev-Andrievskiy A, Popova A, Boyle R, Alberts J, Shenkman B, et al. (2014) Mice in Bion-M 1 Space Mission: Training and Selection. PLoS ONE 9(8): e104830.
7. Торопова К.А., Анохин К.В., Тиунова А.А.. Блокада деацетилирования гистонов в мозге модулирует экспрессию транскрипционных факторов c-fos и ZENK и потенцирует образование долговременной памяти у новорожденных цыплят. Журнал Высшей Нервной Деятельности, 2014, том 64, № 5.

Верно

Заместитель директора по научной работе,
доктор медицинских наук

С.С. Перцов

«16» сентября 2014 года

