

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента Хлебниковой Надежды Николаевны  
на диссертацию Брошевицкой Надежды Дмитриевны  
«Влияние раннего провоспалительного стресса на тревожно-депрессивное,  
социальное и оборонительное поведение крыс разного пола»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.5. «Физиология человека и животных» (биологические науки)**

### **Актуальность темы исследования**

Диссертационное исследование Н.Д. Брошевицкой выполнено в рамках фундаментальной медико-биологической проблемы изучения влияния стресса в раннем возрасте на эмоционально-мотивационное и социальное поведение, на процессы обучения и памяти и на формирование индивидуально-групповых особенностей стресс-реактивности у взрослых индивидов разного пола.

Аверсивные воздействия в неонатальном периоде считаются одним из основных триггерных факторов «перинатального программирования» поведенческих паттернов взрослого организма, а также его эндокринного и иммунологического статуса, во многом определяющего предрасположенность индивида к развитию психических нарушений, таких как тревожные и депрессивные расстройства, когнитивные дисфункции, проблемы в социальном взаимодействии.

Психические заболевания вносят значительный вклад в глобальное бремя болезней. Более миллиарда человек во всем мире страдают психическими расстройствами; которые являются как основной причиной инвалидности, так и значительным фактором риска преждевременной смертности. На всех уровнях социально-демографического развития эти показатели неуклонно возрастают. Экономические затраты, связанные с этим бременем, в 2019 г, оценивались примерно в 5 трлн. \$ (Arias et al., 2022).

Негативные события в раннем постнатальном онтогенезе, по мнению большинства исследователей, повышают восприимчивость организма к повторным стресс-стимулам, что ведет к проблемам эмоциональной регуляции в более позднем возрасте. Однако часть индивидов, подвергшихся раннему стрессированию, во взрослом возрасте демонстрирует достаточную стрессоустойчивость. В настоящее время появляется все больше доказательств того, что уязвимость к факторам внешней среды неодинакова у лиц разного пола. Экспериментальные исследования показывают, что нейропластические изменения, функциональные и молекулярные аспекты функционирования гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси и иммунной системы, возникающие в ответ на действие внешних стимулов, различаются у самцов и самок. Понимание того, когда и как возникают различия в стресс-реактивности, имеет решающее значение для выявления прогностических факторов стресс-чувствительности и нейробиологических механизмов, определяющих индивидуальную реакцию на стресс у особей разного пола.

В настоящее время доказана двусторонняя связь между стрессом и иммунной системой. С одной стороны, нейровоспаление рассматривают как одну из возможных причин развития нервно-психических нарушений. С другой стороны, существуют механизмы контроля иммунной системы со стороны ЦНС. В этой парадигме весьма перспективным подходом представляется применение модели раннего провоспалительного стресса у крыс для неонатальной модуляции активности иммунной

системы и последующей оценки индивидуально-групповых и половых особенностей поведения животных, а также состояния стресс-реализующих систем. Кроме того, несомненный интерес представляет та часть работы, в которой диссертант оценивает влияние различных условий содержания животных (социальная изоляция / обогащенная среда) на состояние иммунной и эндокринной систем и определяемые (или маркируемые) ими характеристики поведения.

Накопленные за последние годы данные подтверждают связь между стрессом, воспалением и уязвимостью индивида к развитию нервно-психических заболеваний. Исследования эндофенотипов, проводимые в рамках индивидуально-группового подхода, открывают новые возможности для экспериментального изучения нейробиологических механизмов развития нарушений, выявления поведенческих, физиологических и биохимических маркеров таких состояний и определения новых мишеней для терапии расстройств, связанных со стрессом, с учетом половых различий.

Однако наше понимание связей между инфекционной нагрузкой (реакцией воспаления) и возникновением психопатологий по-прежнему является далеко не полным. Также явно недостаточно исследований этих механизмов у особей обоего пола.

В работе Н. Д. Брошевицкой была поставлена цель изучить влияние раннего провоспалительного стресса на тревожно-депрессивное и социальное поведение, а также на различные оборонительные условные рефлексы и нейроэндокринную реактивность у взрослых крыс разного пола, что, с учетом вышеприведенных сведений, свидетельствует о несомненной актуальности данного диссертационного исследования.

### **Общая характеристика диссертации, её завершенность**

Диссертация построена по традиционному плану, включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и список использованной литературы. Работа изложена на 192 страницах, хорошо иллюстрирована - содержит 34 рисунка и 9 таблиц, 3 из которых обобщают полученные результаты. Список литературы содержит 268 источников, из них примерно 20 русскоязычных источников (помимо публикаций автора диссертационного исследования). Может показаться, что такое соотношение не отражает в полной мере вклад отечественных авторов в изучение поставленной проблемы. Однако следует отметить, что Н.А. Брошевицкая цитирует работы российских ученых в зарубежных журналах.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность работы, четко обозначает цель исследования и ставит задачи, отражающие его этапы. Лаконично сформулированы положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы занимает 27 страниц и включает восемь подразделов (логично было бы объединить информацию в более крупные подглавы), в которых рассмотрены индивидуально-групповые и половые различия в тревожно-депрессивном и оборонительном поведении животных (пп.1.1, 1.2), влияние раннего провоспалительного стресса на поведение и биохимические показатели крови животных (пп 1.3 – 1.7) и влияние разных условий содержания на поведение крыс в аверсивных ситуациях (п. 1.8).

В пп. 1.1, 1.2. диссертант излагает сведения о методических подходах к тестированию тревожности и страха у грызунов и об индивидуальных различиях поведения животных в этих тестах. Отсюда вытекает необходимость выделения внутри

одной популяции групп животных со сходным эндотипом, и появляется возможность разделять животных на такие группы на основании выявленных особенностей поведения. Приводятся интересные данные о взаимосвязи проявлений тревожности и страха у крыс и обсуждаются гипотезы, объясняющие эту связь с точки зрения когнитивных процессов (памяти), уровня реактивности или наличия доминирующей оборонительной стратегии (пассивной или активной) у крыс. В свете современных тенденций изучения стресса и его последствий, последнее предположение кажется очень перспективным. К сожалению, в дальнейшем изложении материала, автор больше не использует «индивидуально-групповой подход», делая акцент на половых различиях.

В пп. 1.3 – 1.7 описано влияние раннего провоспалительного стресса на поведение самцов и самок крыс. Однако общие сведения о самой модели и ее модификациях в подразделе 1.3. «Модель раннего провоспалительного стресса на животных» не приведены. В последующих разделах обзора есть информация о разных сроках введения ЛПС в раннем онтогенезе, эффектах острого и хронического введения и т.д., читателю было бы проще составить представление об особенностях модели, если бы данные были представлены более последовательно.

Опираясь на большое количество источников, среди которых есть как классические так и недавно опубликованные работы, автор показывает, что влияние бактериального липополисахарида на тревожно- и депрессивно-подобное поведение грызунов: а) разнонаправленное – может как усиливать, так и ослаблять признаки указанных состояний; б) может сохраняться или исчезать во взрослом возрасте; в) может различаться у животных с исходно различными поведенческими фенотипами (высоко- и низкотревожные) г) самцы более чувствительны к раннему провоспалительному стрессу. Очень интересны факты о том, что у взрослых животных со сформировавшейся нейрориммунно-эндокринной системой липополисахарида вызывает нарушение обучения с аверсивным подкреплением, в то время как воздействие в неонатальном периоде не дает таких однозначных результатов. Нарушение социального взаимодействия связывают с изменениями в микробиоме, которые лежат в основе обонятельного социального отворачивания со стороны конспецификов. Вопрос о социальной мотивации и социальном доминировании у крыс после неонатального провоспалительного стресса остается открытым.

В обзоре приведены современные представления о работе гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и стресс-ассоциированных систем головного мозга, описаны долгосрочные эффекты нейровоспаления в раннем постнатальном возрасте на стресс-реактивность организма, в том числе, на уровень кортикостерона в крови крыс разного пола. Диссертант приводит известные в настоящий момент сведения о различиях иммунного ответа на патогены у самок и самцов, включая данные о состоянии глиальных клеток и продукции цитокинов в ответ на введение липополисахарида. Однако данные об ИЛ-1бета, уровень которого оценен в работе, не приведены. Остается неясным, почему именно этот провоспалительный цитокин был выбран.

В последнем разделе обзора (п.1.8) Н.Д. Брошевицкая рассматривает влияние благоприятных (обогащенная среда) и неблагоприятных (социальная изоляция) факторов внешней среды, способных, по мнению автора, модулировать изменения поведения, индуцированные ранним провоспалительным стрессом.

В целом, обзор достаточно полно знакомит читателя с современным уровнем развития проблемы и освещает малоизученные аспекты темы. Обширный фактический материал, представленный в обзоре литературы, свидетельствует о хорошей научно-теоретической подготовке диссертанта.

Как следует из раздела «Материалы и методы исследования», в работе были использованы адекватные «классические» методы оценки изучаемых типов поведения, а также современный иммуноферментный анализ для оценки биохимических показателей крови. Корректное применение методик подтверждает высокую научно-квалификационную подготовку диссертанта. К описанию методик имеется ряд замечаний не принципиального характера, которые были обсуждены с автором.

Результаты экспериментов изложены в 5 главах, в которых приведены данные о нарушениях различных типов поведения у взрослых крыс после неонатального провоспалительного стресса и сопровождающих эти нарушения изменениях биохимических показателей крови, а также о влиянии факторов внешней среды (условий содержания) на проявления раннего провоспалительного стресса у взрослых крыс. Каждая глава завершается обсуждением результатов и промежуточными выводами, что, безусловно, облегчает понимание каждого раздела. К сожалению, отсутствует общее обсуждение и сопоставление полученных данных, что несомненно представляет интерес с точки зрения влияния нейровоспаления в раннем возрасте на формирование индивидуальной устойчивости/уязвимости организма к стрессу, механизмов реализации этих свойств и, возможно, поведенческих и биохимических маркеров таких состояний у особей разного пола. Завершается диссертация кратким заключением и обоснованными выводами, отражающими основное содержание работы в полном соответствии с поставленными задачами.

### **Научная новизна**

Использование большого количества методик тестирования поведения позволило автору получить комплексную оценку влияния раннего провоспалительного стресса на поведение взрослых животных. В диссертационной работе Н.Д. Брошевицкой получены приоритетные данные, свидетельствующие о том, что нейровоспаление в неонатальном периоде приводит у самцов к формированию пассивно-оборонительной стратегии поведения в условиях действия болевого раздражителя, проявляющейся в облегчении выработки и затруднении угашения пассивно-оборонительных реакций, а также в ухудшении выработки активно-оборонительных реакций, что, по мнению автора, связано с повышением значимости для них аверсивных стимулов. Впервые обнаружены половые различия в социальном поведении взрослых крыс, подвергнутых действию бактериального липополисахарида на 3 и 5 дни жизни: только у самцов развивались признаки агрессивности, увеличивался уровень социального доминирования и неагрессивного социального взаимодействия. Таким образом, автор показал, что самцы более чувствительны к раннему провоспалительному стрессу, чем самки.

Очень интересны принципиально новые данные по модуляции последствий раннего провоспалительного стресса в подростковом возрасте путем выращивания крыс в разных условиях содержания. Впервые показано, что самки, пережившие неонатальный провоспалительный стресс, более подвержены негативному действию социальной изоляции, чем самцы. В то же время, самцы в наименьшей степени способны к коррекции

нарушений поведения, вызванных ранним провоспалительным стрессом, путем выращивания животных в обогащенной среде.

Впервые выявлены половые различия в вовлеченности гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы и иммунной системы в стресс-реакцию на повторный стресс во взрослом возрасте: у самок повышается уровень кортикостерона, у самцов – уровень ИЛ-1бета.

### **Научно-практическая значимость**

Диссертационное исследование Н.Д. Брошевицкой расширяет современные представления о влиянии раннего провоспалительного стресса на тревожно-депрессивное, оборонительное и социальное поведение взрослых животных разного пола, а также о влиянии различных условий содержания, таких как социальная изоляция и обогащение среды, на поведение животных, переживших ранний провоспалительный стресс. Модель дает возможность исследования механизмов отдаленных последствий аверсивного воздействия в раннем возрасте, причем воздействия конкретного, с известным механизмом запуска воспалительной реакции, на функционирование нервной системы и появления патологических симптомов – развитие признаков тревоги и депрессии, агрессии у самцов. Используемый диссертантом подход, заключающийся в применении двойного стресса – неонатального провоспалительного и последующего отсроченного острого или хронического – показал свою эффективность для выявления половых различий в поведении животных и ассоциированных с нарушениями поведения нейрохимических маркеров. Такой подход предполагает различные модификации и перспективен для практического использования в лабораторной практике моделирования психопатологических нарушений в научно-исследовательских институтах соответствующего профиля.

Значимыми представляются результаты, свидетельствующие о возможном усугублении негативных последствий раннего стресса в условиях длительной социальной изоляции (с учетом недавно завершившегося изоляционного режима в условиях пандемии, эти сведения особенно актуальны). Напротив, нахождение в обогащенных условиях могут иметь практическое применение для снижения уровня тревожности и агрессивности, уменьшения проявления страха

Исследование Н. Д. Брошевицкой вносит вклад в развитие представлений о роли нейровоспаления в формировании повышенной реактивности на стресс и последующих изменений поведения и ГГА-оси и системы иммунитета, что способствует более глубокому пониманию патогенеза такого рода нарушений и разработки их комплексной патогенетической терапии.

### **Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Результаты получены в хорошо спланированном исследовании на достаточно большой выборке животных (244 крысы обоего пола). Поставленные задачи решены в четырех экспериментальных сериях по единому четкому плану, результаты воспроизводимы. Использована батарея тестов для оценки поведения по большому количеству показателей, дающих комплексную оценку состояния взрослых животных,

подвергнутых раннему стрессированию и воздействиям различных условий содержания в подростковом возрасте. Помимо методик оценки поведения, использованы современные методы биохимического анализа систем стресс-реактивности и нейровоспаления у крыс. Статистическая обработка данных выполнена с применением современных методов биометрики, с учетом, в случае необходимости, поправки на множественность сравнений. Итоги работы сомнений не вызывают, степень достоверности и обоснованности научных положений и выводов высокая.

### **Полнота публикаций диссертационного исследования**

По результатам исследования опубликовано 6 статей в рецензируемых научных изданиях, включая рекомендованные ВАК Минобрнауки РФ по специальности 1.5.5. «Физиология человека и животных» и приравненные к ним публикации. В трех статьях Н.Д. Брошевицкая является первым автором.

Автореферат полно отражает содержание диссертационной работы, положения диссертации и оформлен в соответствии с существующими требованиями.

### **Замечания и вопросы по диссертации**

Принципиальных возражений по диссертационному исследованию нет. В тексте встречаются опечатки, неточности, неудачные стилистические обороты, не снижающие, однако, ценность представленной работы.

При ознакомлении с экспериментальной частью работы возникли следующие вопросы, имеющие, главным образом, дискуссионный характер:

- 1) В исследовании получены данные о том, что ранний стресс изменяет выработку условных рефлексов на аверсивный раздражитель у самцов: улучшает обучение в классическом УР и ухудшает в УРАИ. У самцов медленнее идет угашение реакции замиранья. Как провоспалительный стресс в раннем возрасте влияет на процессы памяти при обучении с положительным подкреплением?
- 2) Основные нарушения в поведении животных, перенесших неонатальный нейровоспалительный стресс, наблюдали в подростковом возрасте (1 мес.). У взрослых животных в возрасте 3 и 6 мес. практически нет изменений в поведении, но есть различия в уровне кортикостерона у самок и ИЛ-1бета у самцов. О чем свидетельствуют эти изменения? Есть ли связь между рассматриваемыми типами поведения и их предполагаемыми нейрхимическими маркерами? Есть ли данные (Ваши или других авторов) о связи рассматриваемых биохимических показателей с обучением (в соответствующей главе это не обсуждается)?
- 3) Чем обоснован выбор ИЛ-1бета в качестве маркера стресса? В работе показано, что при повторном стрессе уровень ИЛ-1 больше у самцов, получивших липополисахарид в неонатальном возрасте, по сравнению с контрольными животными. Вы говорите о стресс-реактивности системы, но данные о фоновом уровне ИЛ-1бета в работе не приведены. Возможно, различия вызваны не стресс-воздействием, а стойким возрастанием уровня ИЛ-1бета после раннего стресса? Как его уровень зависит от пола и возраста в норме? Можно ли по одному маркеру делать вывод о сенситизации воспалительного процесса? Можно ли по отсутствию изменений ИЛ-1бета у самок говорить о том, что у них нет сенситизации?

Высказанные критические замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования и не снижают его значимости

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Брошевицкой Надежды Дмитриевны «Влияние раннего провоспалительного стресса на тревожно-депрессивное, социальное и оборонительное поведение крыс разного пола» является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи в области физиологии человека и животных, а именно изучения особенностей эмоционально-мотивационного поведения, социальности, условно-рефлекторного поведения в условиях действия аверсивных стимулов и ассоциированных с этими паттернами изменений биохимических показателей нейровоспаления у взрослых самцов и самок крыс, перенесших неонатальный провоспалительный стресс. По актуальности темы, объему выполненных автором исследований, новизне полученных данных и их научно-практической значимости, опубликованным результатам диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. в действующей редакции, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. «Физиология человека и животных» (биологические науки).

Официальный оппонент  
доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник лаборатории общей патологии нервной системы  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Хлебникова Надежда Николаевна

«11» ноября 2022 г.

Контактные данные: Тел.: +7(926)348-80-90 e-mail: nanikh@yandex.ru  
Адрес места работы: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8, ФГБНУ «НИИОПП»  
Тел. рабочий: +7 499 151-1756 e-mail рабочий: niiopp@mail.ru

Подпись д.б.н. Н.Н. Хлебниковой заверяю  
ВРИО Ученого секретаря  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,  
кандидат медицинских наук

«11» ноября 2022 г. Кожевникова Елена Николаевна

