

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Толстиковой Татьяны Генриховны
на диссертационную работу Комышевой Натальи Петровны
на тему: «Влияние доксициклина на экспрессию регуляторов
нейропластичности и поведение животных в норме и условиях
нейровоспаления», представленную к защите на соискание
ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность избранной темы

Депрессивные и тревожные расстройства занимают лидирующие позиции по негативному влиянию на активность и качество жизни людей. Однако лекарственные препараты, применяемые в настоящее время для лечения этих расстройств, имеют ограниченную эффективность и, как правило, требуют длительного применения, что обуславливает поиск новых средств и мишеней их действия для более успешной терапии. Недавнее включение в патогенез психоэмоциональных расстройств повышения уровней центральных и периферических провоспалительных цитокинов привело к проверке возможности добавления в схему терапии этих заболеваний противовоспалительных препаратов. Среди наиболее активно исследуемых в это связи потенциальных терапевтических средств находятся тетрациклиновые антибиотики, например, миноциклин, добавка которого улучшала клинический эффект традиционных антидепрессантов.

Объектом представленной диссертационной работы был выбран другой тетрациклиновый антибиотик – доксициклин, характеризующийся меньшими по сравнению с миноциклином негативными побочными эффектами. Его длительное применение при лечении тяжелых трансмиссивных заболеваний человека (клещевой боррелиоз (болезни Лайма), моноцитарный эрлихиоз и иксодовый гранулоцитарный анаплазмоз человека), наряду с положительными противовоспалительными, антимикробными свойствами, приводило к заторможенности психических и двигательных реакций, рассеиванию внимания, нейротоксичности, кумуляции в ретикуло-эндотелиальной системе и костной ткани, а также к лейкопении. Вместе с тем, в предварительных экспериментах на животных обнаружено снижающее тревожное и депрессивно-подобное поведение влияние доксициклина. Причины и следствие таких воздействий этого антибиотика еще до конца не известны.

В этой связи, диссертационная работа Комышевой Натальи Петровны, посвященная изучению влияния доксициклина на экспрессию регуляторов нейропластичности и

поведение животных в норме и условиях нейровоспаления, является актуальной и значимой.

Научная новизна и значимость полученных автором результатов для науки и практики

В настоящее время имеющиеся данные о влиянии доксициклина на регуляторы нейропластичности и поведение животных представлены в ряде единичных экспериментальных работ и небольшим числом противоречивых клинических наблюдений. Научной новизной диссертационной работы является впервые выявленное свидетельство того, что умеренное антидепрессивно-подобное действие антибиотика доксициклина проявляется в условиях активации эндотоксином нейровоспаления и ассоциируется с увеличением экспрессии антиапоптозного белка Bcl-xL в мозге. Также было впервые обнаружено, что доксициклин способен ослаблять вызванное эндотоксином угнетение двигательной активности и повышение тревожного поведения животных путем снижения активации микроглиальных клеток в ряде областей головного мозга, среди которых миндалина, гипоталамус и средний мозг. Впервые было выявлено, что одним из механизмов индукции липополисахаридом тревожности животных является увеличение экспрессии матриксной металлопротеиназы-9 в миндалине.

Полученные данные представляют ценность, как для фундаментальной науки, так и для возможного их практического использования в терапии не только нервных расстройств, но и в комплексной терапии других заболеваний. Поскольку исследуемый антибиотик доксициклин является широко применяемым антибиотиком, выявление его возможных центральных и поведенческих эффектов представляет несомненную практическую значимость. Также практически важным является определения сроков длительности применения доксициклина, которые являются менее безопасные для пациентов.

Общая характеристика работы

Диссертация изложена на 121 страницах машинописного текста и содержит 27 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания методов и материалов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературных источников. Библиографический список содержит 350 источников, включающих публикации по большей части в международных изданиях.

Во «Введении» имеются необходимые подразделы, представлена актуальность исследования, цель и задачи выполнения работы, научная новизна и практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту, приводится степень апробации полученных результатов и личный вклад соискателя в работу.

Обзор литературы изложен на 25 страницах и состоит из 3 разделов и заключения. Первый раздел посвящен общим представлениям о вовлечении в развитие

психоэмоциональных расстройств, таких как тревожность и депрессия, многофакторных процессов, что создает сложности в выявлении конкретных мишеней для их эффективной терапии. Далее описаны современные представления о причинах и путях активации нейровоспаления, сопровождаемого изменением активности ряда критических для регуляции психоэмоциональных функций систем, включающих нейромедиаторные, нейроэндокринные, нейротрофические, апоптотические и нейровоспалительные системы. Подробно представлены некоторые конкретные изменения в этих системах, включающие параметры нейровоспаления, нейротрофины на примере BDNF и анти-апоптотические белки. Обстоятельно рассмотрено влияние противовоспалительных средств на провоцируемые провоспалительными факторами симптомы тревожности и депрессии и некоторые предполагаемые центральные механизмы этих эффектов на примере тетрациклиновых антибиотиков, легко проникающих через гематоэнцефалический барьер в мозг.

Во второй главе “Материалы и методы” приводится описание животных и экспериментальных групп, дизайн исследования. Подробно представлены современные поведенческие методики (тест на потребление сахарозы (оценка ангедонии), тест принудительного плавания (тест Порсолта), приподнятый крестообразный лабиринт), а также современные нейробиологические методы определения экспрессии белков (иммуноблоттинг) и генов (полимеразная цепная реакция в реальном времени).

Статистическую обработку полученных поведенческих и нейробиологических данных проводили однофакторным и двухфакторным дисперсионным анализом с использованием программы STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., USA). Достоверность различий между группами устанавливали согласно LSD критерию Фишера и t-критерию Стьюдента. Прирост массы тела анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа для повторных измерений. Наличие корреляционных взаимоотношений оценивали по Пирсону. Уровень значимости $p < 0.05$.

В главе «Результаты исследований» содержится изложение полученных результатов исследования. По сути работу можно разделить на 3 части: изучение влияния введения только доксицилина (ДОКС), только липополисахарида (ЛПС) и сочетанного введения доксицилина и липополисахарида на поведение животных и экспрессию регуляторов нейропластичности.

В результате исследований было установлено, что эффект препаратов, введенных отдельно, зависит от продолжительности воздействия, а именно, что введение одного ДОКС в течение 4 и 7 дней вызывало транзиторное повышение тревожности, полностью нормализующееся при продолжении введения до 14 дней, отсутствующее после 14-дневного введения, а умеренное антидепрессивно-подобное

действие наблюдалось только после 7 дневного введения, которое ассоциировалось с увеличением уровня анти-апоптозного белка Bcl-xL в гиппокампе.

При введении только ЛПС подтвердился его эффект, проявляющийся в угнетении двигательной активности животных, повышении тревожности и развитии депрессивно-подобного состояния. Эти поведенческие эффекты были ассоциированы с провоспалительной активацией в ряде отделов головного мозга, связанной с снижением уровня белка Bcl-xL в гипоталамусе и стриатуме, что может приводить к ослаблению антинейродегенеративной защиты.

Автором также показано, что однократное введение и в течение 7 и 14 дней введения эндотоксина также активировало периферический иммунный ответ, на что указывало достоверное увеличение веса селезенки животных.

Введение ЛПС в течение 14 дней индуцировало у животных нейровоспаление, проявляющееся увеличением уровня белков Iba-1 в большинстве исследованных отделах мозга и ММР-9 в миндалине.

Однако совместное введение ЛПС с доксициклином в течение 14 дней предотвращало индуцируемые эндотоксином поведенческие изменения, ослабляло активацию микроглии и снижение уровня белка Bcl-xL в структурах мозга.

Важным выводом работы является впервые обнаруженная способность доксициклина оказывать влияние на поведение экспериментальных животных в норме и в условиях активации нейровоспаления. Механизмы этих эффектов могут включать повышающее влияние антибиотика на антиапоптозный белок Bcl-xL, а также ослабление индуцируемой провоспалительным стимулом микроглиальной активации.

Впервые выявлено участие в индукции тревожности введением ЛПС повышения уровня матричной металлопротеазы-9 в миндалине.

В главе “Обсуждения результатов исследования” приводится аргументированный анализ полученных в работе собственных данных в сравнении с литературными источниками.

Хотелось также отметить в работе то, что автор установила именно ту длительность применения доксициклина (14 дней), которое не повлияло на уровень белка Iba-1 в различных отделах мозга нормальных животных, и, следовательно, не привело к снижению количества микроглиальных клеток, экспрессирующих этот белок. Такая схема введения доксициклина, вероятно, позволит снизить степень нежелательного воздействия у пациентов.

Работа завершается заключением и обстоятельными выводами, отражающими полученные в ходе исследования результаты. Высокая степень достоверности полученных

результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам. Автореферат диссертации соответствует ее содержанию.

Результаты данного исследования широко апробированы на российских и международных конференциях, по теме диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах, цитируемых в базах Web of Science и SCOPUS и входящих в перечень ВАК, необходимых для защиты кандидатских диссертаций.

При чтении работы возникли незначительные замечания, не снижающие ценность работы:

- цель исследований перегружена подробностями о характеристике доксицилина;
- не указано, в какой лекарственной форме вводился доксициклин (субстанция, либо в виде солей гидрохлорида или моногидрата?), а также фирма производителя;
- к сожалению, в главе результаты исследования не указывается способ и доза введения препаратов, что не совсем удобно при ознакомлении с работой;
- не указано, на каком количестве животных были проведены исследования.

В качестве дискуссии хотелось получить ответы на следующие вопросы:

1. Чем был обусловлен выбор дозы доксициклина?
2. Как можно объяснить снижение массы тела после однократного введения доксициклина, а потом, начиная с 13 дня его введения - резкое увеличение массы тела?
3. Почему были проведены исследования в тесте приподнятый крестообразный лабиринт на фоне 4 и 14-дневного введения доксициклина, а в тесте Порсолта - однократное, 7 и 14-дневное введение, а проводили на обоих тестах?
4. Для липополисахарида изучалось влияние разных схем введения на массу селезенки, а изучался такой показатель при введении только доксициклина?
5. Какие могут быть рекомендации по применению доксициклина на основании полученных результатов?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Комышевой Натальи Петровны на тему: «Влияние доксициклина на экспрессию регуляторов нейропластичности и поведение животных в норме и условиях нейровоспаления», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора, Шишкиной Галины Трифоновны в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики Сибирского отделения российской академии наук» является законченной научно - практической работой. На основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно

определить как новое достижение в физиологии, молекулярной биологии, медицины. По своей актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикации материалов в научных печатных изданиях, работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (во всех действующих редакциях), предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Комышева Наталья Петровна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент
профессор, доктор биологических наук,
заведующая лабораторией
фармакологических исследований
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Новосибирского института
органической химии им. Н.Н. Ворожцова
Сибирского отделения
Российской академии наук

Толстикова
Татьяна Генриховна

630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 9
тел.: 8(383)330-07-01, вн. тел. 2-49
e-mail: tg_tolstikova@mail.ru

Подпись профессора Т.Г. Толстиковой
Заверяю Ученый секретарь НИОХ СО РАН
к.х.н.



Бредихин Роман Андреевич

24. 02. 2022