

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
Федеральное государственное бюджетное
образовательное
учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный
университет»



С. В. Микушев

2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» на диссертацию Сорокина Ивана Евгеньевича «Влияние длины светового дня на серотониновую систему мозга и поведение мышей и рыб вида *Danio rerio*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5-Физиология человека и животных

Актуальность

Длительность светового дня играет важную роль в жизни многих видов позвоночных. Уменьшение продолжительности светового дня в осенне-зимний период вызывает у чувствительных пациентов сезонное аффективное расстройство (САР), которое рассматривается как атипичная депрессия. Актуальность изучения механизмов и терапии САР определяется высоким риском заболевания в высоких и, даже умеренных, широтах, а также его значительными негативными социальными и экономическими последствиями. Нарушения серотониновой (5-НТ) системы мозга увеличивают риск аффективных расстройств, а транспортер 5-НТ является молекулярной мишенью большинства клинически эффективных антидепрессантов. Более того, была показана эффективность ингибиторов 5-НТ в терапии САР. Однако связь нарушений 5-НТ системы с риском САР до настоящего времени оставалась неясной. Основным фактором, сдерживающим прогресс в изучении САР, является отсутствие корректных моделей для экспериментального изучения механизмов данного заболевания. В 2014 г было показано усиление депрессивно-подобной симптоматики и снижение уровня 5-НТ в мозге у молодых мышей линии C57BL/6 при их длительном коротком световом дне. У лабораторных мышей выявлена мутация C1473G в гене *Trh2*, вдвое снижающая активность триптофангидроксилазы 2 (ТПГ2) – ключевого фермента синтеза 5-НТ в мозге млекопитающих, что открывает возможность экспериментальной проверки связи низкой активности ТПГ2 с чувствительностью к короткому световому дню.

Однако использование мышей для моделирования CAP вызывает ряд справедливых замечаний: (1) мыши ведут сумеречный и ночной образ жизни и для них отсутствие света не является критическим фактором, (2) мыши линии C57BL/6 не могут синтезировать мелатонин, который играет ключевую роль в гипотезах CAP. В то же время, лабораторные рыбы вида *D. rerio* являются дневными животными, живущими вблизи экватора при постоянном световом дне, а их 5-НТ система имеет высокую анатомическую, молекулярную и фармакологическую гомологию с 5-НТ системой мозга млекопитающих. Поэтому рыбы данного вида рассматриваются как перспективный объект для моделирования роли 5-НТ системы в механизме CAP.

В связи с вышесказанным Сорокин И.Е. поставил своей целью выяснение роли 5-НТ системы мозга в реакции мышей и рыб на длительную экспозицию при коротком световом периоде. Выяснились два вопроса: (1) изменения в 5-НТ системе мозга и 5-НТ-зависимом поведении при длительном содержании при коротком световом дне и (2) влияние взаимодействия сниженной активности ТПГ и короткого светового дня на 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение мышей и рыб.

В ходе выполнения работы автором были сформулированы и успешно решены следующие научные задачи:

1) Исследовать влияние длины светового дня на 5-НТ систему мозга и 5-НТ зависимое поведение мышей, различающихся по активности ТПГ2 в мозге, вызванным полиморфизмом C1473G в гене *Trh2*;

2) Изучить влияния длины светового дня на физиологические функции, на 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение рыб вида *D. rerio*.

3) Выяснить влияние взаимодействия сниженной активности ТПГ и короткого светового дня на 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение *D. rerio*.

Научная новизна исследования

В результате проведения работы автором получены новые знания, которые расширяют представления о роли 5-НТ в патологическом действия короткого светового дня на нервную систему и поведение. Впервые в России адаптирована модифицированная модель CAP на мышцах линии C57BL/6. Было впервые изучено влияние длины светового дня и мутации C1473G в гене *Trh2*, снижающей активность ТПГ2, на 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение мышей. Впервые было исследовано влияние содержания при коротком световом дне на физиологические функции, 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение рыб вида *D. rerio*. Впервые было исследовано влияние взаимодействия сниженной активности ТПГ и короткого светового дня на 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение *D. rerio*.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Работа Сорокина И.Е. вносят существенный вклад в понимание (1) характера нарушений 5-НТ системы мозга и регулируемого 5-НТ поведения вызванных содержанием при коротком световом дне и (2) связи реакции на содержание при коротком световом дне с активностью ТПГ. Была разработана принципиально новая техника моделирования механизмов САР на рыбах *D.regio*. Полученные результаты и модели могут в дальнейшем послужить основой для разработки новых и эффективных методов терапии САР. Сделаны практические рекомендации о связи наследственного снижения активности ТПГ2 с факторами риска САР. Дополнены программы обучения для студентов биологических и медицинских специальностей высших учебных заведений.

Структура диссертационной работы

Работа Сорокина И.Е. изложена на 123 стр, включает 22 рисунка, 20 из которых оригинальны и 10 таблиц. Список литературы включает 211 источников. Диссертация имеет классическую структуру, рекомендованную ВАК, и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы и список цитируемой литературы.

Во введении указана актуальность и важность проблемы, кратко охарактеризовано ее состояние на момент начала исследования, выделены нерешенные вопросы и на основании этого поставлены цели и задачи исследования. Подчеркнута новизна полученных результатов и завершенность работы. Представлены источники финансовой поддержки работы (грант РФФИ).

В обзоре литературы рассмотрена проблема САР и критически проанализированы существующие гипотезы о механизмах данной патологии. Наиболее интересная и важная часть обзора посвящена полному анализу всей известной литературы по участию 5-НТ системы мозга в механизме САР. Поскольку основная часть оригинальных статей по данным вопросам была опубликована в 90 годах прошлого века и в начале этого века, это привело к неизбежному увеличению доли «старых» работ в списке литературы. Интересной и важной частью обзора является критический анализ существующих экспериментальных моделей САР, прежде всего модели Otsuka с соавторами. Сорокин И.Е. анализирует достоинства и недостатки существующих моделей, предлагает использование рыб *D.regio* как нового экспериментального объекта для изучения роли 5-НТ системы в патофизиологических механизмах короткого светового дня и обосновывает эту идею на базе существующей информации. Особое внимание в обзоре уделено ключевому ферменту синтеза 5-НТ – триптофангидроксилазе. Обзор

позволяет оценить проблему, что известно, выделить и сформулировать нерешенные вопросы, на решение которых будет направлено исследование.

В разделе материалы и методы содержится исчерпывающая информация о объектах исследования (мышях и рыбах), включающая их содержание и этические нормы, дизайне трех экспериментов, а также подробно описаны стандартные и многократно проверенные методы компьютерной регистрации поведения мышей и рыб с помощью программно-аппаратного комплексов EthoStudio и Phenomaster, определения уровня 5-НТ, 5-Н1АА и активности ТПГ в мозге с помощью ВЭЖХ, определения экспрессии генов в головном мозге с помощью количественной ОТ-ПЦР реального времени и статистические методы анализа результатов. Кроме этого, в разделе подробно описаны разработанные с участием автора принципиально новые методы (1) непрерывной компьютерной регистрации поведения группы рыб в домашнем аквариуме, определения активности моноамиоксидазы с 5-НТ в качестве субстрата и уровня параклорфенилаланина в воде и мозге.

Раздел результаты включает подробное описание и анализ результатов трех экспериментов.

В первом эксперименте Сорокин И.Е. используя модифицированную им модель японских исследователей, исследовал влияние наследственного снижения активности ТПГ2 в мозге на чувствительность мышей к длительному содержанию при коротком дне. Исследование было проведено на уникальных мышях конгенных линий В6-1473С и В6-1473G, которые различались по активности фермента в мозге. Было показано, что содержание при коротком дне увеличивало выраженность депрессивно подобного поведения, снижало уровень 5-НТ, но увеличивало уровень 5-Н1АА и отношение 5-Н1АА/5-НТ в гиппокампе, стриатуме и среднем мозге. Важным результатом является демонстрация статистически значимого взаимодействия генотипа и светового режима на уровень 5-НТ и отношение 5-Н1АА/5-НТ: короткий световой день вызывает изменения этих параметров в данной структуре только у мышей с низкой активностью ТПГ2. В то же время, не выявлена связь между активностью ТПГ2 и выраженностью вызванного коротким световым днем депрессивно-подобного поведения.

Во втором эксперименте автор исследует влияние короткого светового дня на поведение и 5-НТ систему мозга у рыб вида *D. rerio*. Было показано, содержание при коротком дне в течении 60 дней вызвала значительные изменения у рыб: прежде всего это маскулинизация самок, превращение самок в самцов и уменьшение массы тела. На рыбах не разработана модель депрессивно-подобного поведения. Однако было показано, что содержание при коротком дне снижало двигательную активность в незнакомой обстановке и увеличивала уровень 5-Н1АА в мозге рыб.

Третий эксперимент является продолжением и расширением второго. В нем исследовали связь активности ТПГ с выраженностью вызванных коротким световым днем изменений в физиологии, поведении и 5-НТ системе мозга рыб. Поскольку у рыб в отличие от млекопитающих в мозге экспрессируются три ТПГ, самым эффективным способом снижения активности фермента является его фармакологическая блокада парахлорфенилаланином, который как показал автор проникает в мозг, накапливается там и снижает активность 5-НТ системы, что видно по значительному снижению уровня 5-Н1АА. Были подтверждены результаты предыдущего эксперимента: маскулинизация самок, снижение массы тела и двигательной активности в незнакомой обстановке у рыб, содержащихся при коротком световом дне. В то же время, парахлорфенилаланин не влиял на выраженность этих изменений.

В разделе обсуждения полученные результаты анализируются в трех направлениях: (1) сравнение с литературными данными, (2) сравнение реакции на короткий световой день у рыб и мышей и (3) связь вызванных коротким днем изменений с активностью ТПГ. Результаты Сорокина И.Е., полученные в эксперименте на мышах, соответствуют результатам японских исследователей, верифицируя тем самым предложенную ими модель. Результаты на рыбах также в целом подтверждают результаты на мышах: у обоих видов содержание при коротком дне вызывает сходное увеличение уровня 5-Н1АА в мозге. Снижение двигательной активности рыб в новой обстановке можно рассматривать как усиление тревожности. Сорокин И.Е. показал снижение двигательной активности (тревожности) у рыб, содержащихся при коротком дне, что хорошо согласуется с увеличением тревожности у мышей, показанном японскими исследователями и самим автором в других его работах. Наконец, Сорокин И.Е. впервые показал, что умеренно сниженная активность ТПГ не является фактором риска САР, что может иметь эпидемиологическое значение. Автореферат отражает содержание диссертации.

В то же время, выявлены незначительные замечания, которые не умаляют качественный уровень диссертации. Применённые методики в целом описаны во всех деталях, но совершенно не описана методика генотипирования пород мышей, которые использовались в данной работе. В введении отсутствует описание возможности диетической коррекции проявлений САР с помощью предшественника серотонина триптофана и 5-гидрокситриптофана. В целом, выводы соответствуют результатам, но не описаны возможности фармакологической коррекции симптомов САР, которые можно предположить на базе полученных результатов исследования.

Заключение

Диссертационная работа Сорокина Ивана Евгеньевича «Влияние длины светового дня на серотониновую систему мозга и поведение мышей и рыб вида *Danio rerio*», научный

руководитель – доктор биологических наук А.В.Куликов, является целостным, законченным научно-квалификационным трудом, выполненным автором самостоятельно. Работа написана единолично, свидетельствует о высокой профессиональной подготовленности автора и содержит новые научные результаты и положения, касающиеся роли серотониновой системы мозга в реакции на короткий световой день.

По актуальности темы, методическому и научному уровню, новизне и научно-практической значимости полученных результатов, обоснованности научных положений и выводов диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, с изменениями от 18.03.2023 г., предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор Сорокин Иван Евгеньевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5- Физиология человека и животных.

Отзыв составлен Раулем Радиковичем Гайнетдиновым, к.м.н., директором Института трансляционной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», (e-mail: r.gainetdinov@spbu.ru).

Отзыв заслушан и утвержден на расширенном семинаре Института трансляционной биомедицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», протокол № 1 от 26.01.2024 г.

Директор института трансляционной медицины
Санкт-Петербургского государственного университета,
к.м.н.

Р.Р. Гайнетдинов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»
Адрес: 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7-9. Телефон (812) 328-97-01
E-mail: spbu@spbu.ru

Можно считать
удовлетворенным

ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА УЧРЕЖДЕНИЯ
УК ГУОРП

31.01.2024