

## О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Княжевой Марии Александровны «Редактирование депрессивно-подобного фенотипа модулированными *ex vivo* кофеином иммунокомпетентными клетками» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. - аллергология и иммунология

Актуальность. В современном индустриальном обществе депрессивные психозы занимают второе место среди заболеваний по распространенности, экономическим и социальным последствиям. Они представляют значительную медицинскую проблему, которая усугубляется недостаточной эффективностью существующих методов их терапии. Несмотря на то, что антидепрессанты входят в четверку наиболее продаваемых лекарственных средств, они характеризуются высокой вероятностью побочных эффектов, не оказывают терапевтического действия у 30-40% пациентов и имеется высокий риск рецидивов болезни. Поэтому разработка новых более эффективных методов терапии депрессивных психозов является важнейшей и актуальной задачей современной медицины.

Большинство клинически эффективных антидепрессантов действуют на медиаторные системы мозга, серотониновую, дофаминовую и норадреналиновую. Однако имеются многочисленные клинические и экспериментальные доказательства связи депрессивных психозов с нарушением иммунной системы. Согласно кинурениновой и цитокиновой гипотезам, которые признаются большинством исследователей, хроническое воспаление, увеличение секреции провоспалительных цитокинов приводит к нейродегенерации и развитию депрессивной симптоматики. Изучение роли иммунных механизмов для понимания и терапии депрессивных психозов является важной задачей современной психоиммунологии. Поэтому, исследование Княжевой М.А., посвященное экспериментальному редактированию депрессивно-подобного фенотипа мышей модулированными кофеином иммунокомпетентными клетками, несомненно, является актуальным и важным для фундаментальной и медицинской психоиммунологии.

Основная оригинальность и преимущество исследования Княжевой М.А. – применение иммунокомпетентных клеток, спленоцитов, модулированных *ex vivo* кофеином, для коррекции депрессивно-подобных изменений в поведении, иммунной и нервной системе мышей в модели реактивной депрессии. Это обстоятельство позволило автору не только подтвердить ключевую роль нарушений иммунной системы в механизме развития депрессивных (и депрессивно-подобных) нарушений, но и предложить эффективный метод их коррекции.

Структура диссертационной работы. Диссертация представлена на 200 страницах и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список литературы (371 источников). Работа иллюстрируется 30 рисунками, из которых 26 оригинальные и 7 оригинальными таблицами. Список литературы включает в основном современные источники, что свидетельствует об актуальности данного исследования. Как положительный момент следует отметить, что он включает большое количество публикаций отечественных авторов.

Введение. В этом разделе Мария Александровна детально обосновывает актуальность, новизну и оригинальность исследования, формирует цель и задачи. Раздел написан ясно и никаких вопросов по нему не возникает.

Обзор литературы. Включает 56 страниц и состоит из 4 разделов, из которых наиболее проработаны и представляют большой интерес последние три раздела. Следует отметить, что тщательность написания отдельных подразделов сильно различается: важные для понимания темы разделы написаны очень подробно, а маловажные – довольно лаконично. Такой прием позволяет сосредоточить все внимание на важных для темы вопросах. Первый раздел посвящен механизмам формирования большого депрессивного расстройства и рассматривает основные гипотезы механизмов депрессии: моноаминовую, роль стресса, генетическую, нейродегенеративную, воспалительную (инфламмасомную) и цитокиновую. Первые три гипотезы (особенно генетическая) рассмотрены довольно лаконично, но они и не являются ключевыми для темы диссертации. Автор их упоминает скорее для полноты картины. В то же время, последние три гипотезы рассмотрены достаточно подробно с обилием свежей информации о молекулярных процессах, происходящих при нейродегенерации, нейровоспалении и активации иммунной реакции. Следует отметить, что Мария Александровна очень увлекается перечислением молекул и их взаимосвязями при данных процессах и уделяет недостаточно внимания физиологическим значениям этих гипотез, которые хорошо изложены в более ранних работах. Поэтому создается впечатление некоторой хаотичности материала, что затрудняет его восприятие. И, тем не менее, эти разделы обзора литературы изложены чрезвычайно полно, могут использоваться для справок и при небольшой структурной переработке могли бы быть опубликованы в качестве законченного обзора. Второй раздел включает описания, скорее перечислению, существующих моделей для экспериментального изучения механизмов депрессивных расстройств на лабораторных грызунах. Для большинства этих моделей, которые не используются в работе, автор ограничивается простым их перечислением. Важно отметить, что Мария Александровна не



путает модель с тестом, что достаточно редкое явление в литературе и свидетельствует о глубоком понимании предмета. В то же время, модель социального конфликта, которая используется в работе, изложена достаточно подробно и обоснованы ее преимущества по сравнению с другими моделями. Третий раздел посвящен молекулярному механизму иммуностимулирующего эффекта кофеина. Детально описаны потенциальные молекулярные мишени кофеина, такие как аденозиновые рецепторы (AP) A1AR и A2AR и их связь с функциональной активностью иммуннокомпетентных клеток. К сожалению, мало внимания уделено роли кофеина как ингибитора фосфодиэстераз (только упоминается). Кофеин снижает продукцию провоспалительных и, соответственно, увеличивает продукцию противовоспалительных цитокинов. Этот факт явился обоснованием, предложенного Княжевой М.А. и ее коллегами метода терапии депрессивно-подобных состояний с помощью стимулированных кофеином *ex vivo* иммуннокомпетентных клеток.

Материалы и методы. В работе использовалось большое количество разнообразных современных методов исследования: поведенческих, клеточных, гистологических, иммуноферментных (определение уровня цитокинов и BDNF) и биохимических (определение уровня триптофана). Все использованные методы описаны очень подробно и их корректность сомнения не вызывает. Исследования выполнены на самцах гибридах F1(CBA x C57BL/6). К сожалению автор не обосновывает выбор данных животных. С помощью последовательной серии из 20 поражений в агрессивном конфликте у части из них развивалась стойкая депрессивно-подобная симптоматика. Такая модель депрессии используется многими авторами и рассматривается как корректная. К сожалению автор не сообщает о доле животных, у которых развивалась депрессивно-подобная симптоматика. Подробно описан процесс получения живых спленоцитов, их стимуляция кофеином, проверка эффективности стимуляции и введение реципиентам. Поведение в тестах «принудительное плавание» и «потребление сахарозы» (ангедония) регистрировали и анализировали автоматически. Непонятно почему двигательную активность в тесте «открытое поле» регистрировали визуально. Результаты анализировали с помощью корректных статистических методов. Непонятно, почему автор перенесла описание дизайна экспериментов из раздела «Материалы и методы» в раздел «Результаты».

Результаты сгруппированы в три раздела. В первом разделе приводятся результаты фенотипирования мышей с 20 кратным опытом поражений и приводятся доказательства формирования у них депрессивно-подобного фенотипа. На уровне поведения показано снижение исследовательской активности в тесте «открытое поле», снижение предпочтения

сладкой воды (агедония) и увеличение неподвижности в тесте «принудительное плавание». На уровне иммунного ответа установлено снижение АОК, спонтанной и индуцированной пролиферативной активности спленоцитов, увеличение спонтанной и индуцированной продукции провоспалительных цитокинов. На уровне нервной системы установлено снижение плотности нейронов в различных областях гиппокампа, повышение уровня провоспалительных цитокинов в ряде структур мозга. Все эти изменения характеризуют депрессивно-подобный фенотип и подтверждают корректность модели.

Во втором разделе Княжева М.А. экспериментально подбирает оптимальную концентрацию кофеина для стимуляции спленоцитов *ex vivo* основываясь на способности этих стимулированных спленоцитов при введении их мышам с депрессивно-подобным фенотипом увеличивать двигательную и исследовательскую активности последних в тесте «открытое поле». В качестве оптимальной была выбрана концентрация 100 мкг кофеина на  $15 \times 10^6$  клеток. В третьем разделе Мария Александровна изучает влияние стимуляции кофеином на характеристики спленоцитов. Она показала, что стимуляция кофеином спленоцитов, выделенных из самцов с опытом поражений, увеличивает их спонтанную и индуцированную пролиферационную активность, секрецию противовоспалительных цитокинов и снижает секрецию провоспалительных цитокинов.

В четвертом разделе Княжева М.А. демонстрирует, что системное введение обработанных кофеином спленоцитов сингенным самцам с депрессивно-подобным фенотипом уже через 24-48 ч после введения статистически значимо снижает у них выраженность депрессивно-подобной симптоматики. На уровне поведения это выражается в увеличении двигательной и исследовательской активностей в тесте «открытое поле», предпочтении сладкой воды, снижении депрессивно-подобной неподвижности в тесте «принудительное плавание». На уровне иммунной системы приводит к увеличению пролиферационной активности спленоцитов, секреции противовоспалительных цитокинов и уменьшению секреции провоспалительных цитокинов. На уровне нервной системы вызывает увеличение плотности нейронов в гиппокампе, уровня BDNF в гиппокампе и префронтальной коре, уровня противовоспалительных цитокинов и снижению уровня провоспалительных цитокинов в различных отделах мозга. Иными словами, оказывает выраженный антидепрессантный эффект.

В целом проделана огромная экспериментальная работа, полученные данные представлены в 20 рисунках и 7 таблицах, корректно статистически проанализированы и не вызывают



сомнения. Каждый раздел начинается небольшим обзором и оканчивается кратким обсуждением, что значительно облегчает понимание результатов.

Обсуждение. В данном разделе Княжева М.А. анализирует полученные результаты с литературными данными, чтобы понять их физиологическое значение. Анализ получился полный и убедительный. К сожалению, это привело к вынужденному частичному повторению результатов, что увеличивает размер раздела «Обсуждение» и затруднило понимание ключевых результатов. Самой интересной и важной частью «Обсуждения» является попытка автора найти механизм такого быстрого и эффективного антидепрессантного действия стимулированных кофеином *ex vivo* спленоцитов. Княжева М.А. считает, что стимулированные спленоциты проникают в селезенку и мозг реципиентов, где они взаимодействуют с пораженными иммунокомпетентными клетками и восстанавливают функцию последним. Автор приводит доказательства проникновения стимулированных клеток в селезенку и мозг. В то же время, создается впечатление, что автор не принимает в серьез тот факт, что стимулированные кофеином спленоциты являются источником противовоспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, могут оказывать антидепрессантный эффект.

Заключение. В этом разделе Княжева М.А. подводит краткий итог полученным результатам. Это по сути краткий пересказ результатов с подчеркиванием их новизны и значимости. Этот раздел написан простым языком и очень полезен для общего представления о проделанной работе.

Выводы. Выводы соответствуют результатам и связаны с поставленными в исследовании задачами.

Реферат содержит основные результаты работы (кроме описания депрессивно-подобного фенотипа), очень содержателен и легче воспринимается чем сама диссертация.

Работа Княжевой М.А. имеет большое фундаментальное значение для нейробиологии и психоиммунологии, поскольку предоставляет новые доказательства тесной связи между нарушениями иммунной системы организма и психическими расстройствами (депрессия): развитие депрессивно-подобной симптоматики сопровождается нарушениями иммунной системы, а нормализация функции иммунной системы сопровождается снижением выраженности депрессивно-подобной симптоматики. Марией Александровной разработан эффективный способ клеточной терапии некоторых форм депрессивно-подобных нарушений с помощью инъекции иммунокомпетентных клеток, стимулированных кофеином.

Замечания и пожелания. При прочтении диссертации возник ряд вопросов, замечаний и пожеланий.

1. Чем обоснован выбор мышей F1(CBA x C57BL/6)?
2. Какой процент животных, у которых после 20 поражений развивался депрессивно-подобный фенотип?
3. Почему не использовали EthoVision для автоматизации измерения двигательной активности в тесте «открытое поле»?
4. В разделе «Материалы и методы» написано, что спленоциты вводились в орбитальный синус, а в разделе «Результатах», что их вводили внутривенно. Как все-таки вводили спленоциты?
5. В разделе «Результаты» достоверности приводятся только в рисунках и таблицах в виде звездочек. Почему нигде в диссертации и автореферате не приводятся значения критериев со степенями свободы, как это принято в ведущих журналах? Критерий F приводится только в одном месте на странице 119, но без степеней свободы.
6. Антидепрессантный эффект спленоцитов развивается в течении 24-48 часов. По сравнению с классическими антидепрессантами это практически мгновенно. Хотелось бы знать, как долго этот эффект продолжается.
7. Хотелось бы знать, как автор теоретически и технически представляет применение разработанной им клеточной технологии для лечения депрессивных психозов.

Несмотря на возникшие замечания, диссертационная работа Княжевой Марии Александровны выполнена на уровне, соответствующим самым высоким международным стандартам, предъявляемым к работам по нейроиммунологии, и составляет хорошее впечатление. Объем материала поражает воображение. Огромный экспериментальный материал, полученный Княжевой М.А., представлен в 14 публикациях в отечественных и международных журналах. Все они входят в список ВАК. Имеется патент. Результаты обсуждены специалистами на большом числе отечественных и международных конференциях и сомнения не вызывают.



Диссертационная работа Княжевой Марии Александровны «Редактирование депрессивно-подобного фенотипа модулированными ex vivo кофеином иммунокомпетентными клетками» полностью соответствует требованиям, которые сформулированы в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 26.01.2023 № 101), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. - аллергология и иммунология.

Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных в работе диссертационного совета Д 001.001.XX (24.1.184.01) на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии Российской академии наук»

Заведующий сектором генетических коллекций  
нейропатологий  
Федерального  
государственного бюджетного научного  
учреждения «Федеральный исследовательский  
центр Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии  
наук», главный научный сотрудник, доктор  
биологических наук



Куликов Александр Викторович

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Адрес: 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10

Тел.: +7 (383) 363-49-80; факс: +7 (383) 333-12-78

E-mail: [icg-adm@bionet.nsc.ru](mailto:icg-adm@bionet.nsc.ru)

Сайт: <http://www.bionet.nsc.ru/>

Подпись заведующего сектором, д.б.н. Куликова А.В. ЗАВЕРЯЮ

ученый секретарь ИГиГ СО РАН, к.б.н. Орлова Г.В.



31.05.2023

