

**ОТЗЫВ**  
**официального оппонента Хлебниковой Надежды Николаевны**  
**на диссертацию Мартюшевой Анны Сергеевны**  
**«Возрастные и половые особенности физиологических показателей у крыс после**  
**пренатального стресса»,**  
**представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук**  
**по специальности 1.5.5. «Физиология человека и животных» (биологические науки)**

**Актуальность темы исследования**

Диссертационное исследование А. С. Мартюшевой выполнено в рамках фундаментальной медико-биологической проблемы изучения влияния пренатального стресса на формирование у потомства здорового фенотипа или предрасположенности к болезни, интерес к тому, как средовые факторы раннего онтогенеза, начиная с внутриутробного периода, могут отражаться на состоянии физического и психического здоровья индивида на протяжении всей жизни, неуклонно возрастал в последние три десятилетия. По очень приблизительной оценке по данным базы PubMed в последние 5-7 лет по этой теме ежегодно публикуется около 300 статей (для сравнения, 1960 по 1990 г. опубликовано примерно 150 работ). Исследователи сформулировали «гипотезу фетального программирования» («программирования развития»), согласно которой действие сильных / длительных стрессоров в критические периоды развития потомства оказывает существенное влияние на формирование биологических систем, вовлеченных в адаптацию индивидов к условиям окружающей среды: центральной и вегетативной нервной системы (ЦНС и ВНС), нейроэндокринной (гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН)) и иммунной систем. Изменение функционирования этих систем может приводить к появлению соматических и психических проблем со здоровьем в подростковом и взрослом возрасте. Эпидемиологические данные, свидетельствуют о том, что самыми мощными экологическими факторами, способными влиять на развитие и здоровье потомства, являются гестационные стрессы, первые наблюдения заключались в том, что более низкий вес при рождении, взятый в качестве косвенного показателя аверсивного воздействия во время беременности, является фактором риска развития сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний (артериальная гипертензия, ожирение, диабет), а также психических нарушений (депрессивные и тревожные расстройства, когнитивные дисфункции, проблемы в социальном взаимодействии). Позже было выяснено, что последствия материнского стресса зависят от срока беременности. Недоедание в первом триместре приводит к рождению детей с предрасположенностью к ишемической болезни сердца и ожирению, а дефицит питания в середине беременности отражается, в первую очередь, на функционировании дыхательной системы. В ряде работ сообщается о половых различиях в поведенческих и метаболических изменениях, вызванных пренатальным стрессом. Предполагают, что аффективные расстройства чаще встречаются у девочек, тогда как шизофрения и дефицит внимания – у мальчиков. Однако результаты подобных исследований противоречивы. Несмотря на то, что существует множество доказательств отрицательной связи между пренатальным материнским стрессом и негативными последствиями у потомства, нет последовательных доказательств конкретных механизмов воздействия стресса в утробе матери. Этические соображения в исследованиях с участием людей не позволяют нам полностью понять фенотипические изменения, происходящие у конкретного человека, и то, как его здоровье ухудшается в краткосрочной или долгосрочной перспективе. В связи с этим необходимо проведение доклинических исследований на животных.

В работе А. С. Мартюшевой была поставлена цель изучить особенности поведения, метаболических параметров и иммунных показателей в разные периоды постнатального онтогенеза у потомства самок крыс, подвергнутых ежедневному помещению в холодную

воду с 10-го по 16-й день гестации, 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 исследования», «Обсуждение результатов», «Выводы» и список использованной литературы. Работа изложена на 164 страницах, содержит 26 рисунков и 18 таблиц, 3 из которых обобщают полученные результаты. Следует, однако отметить, что рисунки дублируют результаты, представленные в таблицах. Список литературы содержит 322 источника, из них 154 отечественные работы (помимо публикаций автора диссертационного исследования), что оставляет безусловно положительное впечатление, и демонстрирует знакомство автора с разработанностью проблемы в России.

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 35 страниц и включает три подраздела, в которых рассмотрены классические положения учения о стрессе и современные представления о механизмах его развития, в том числе, о роли цитокинов в реализации стресс-реакции; проанализированы физиологические процессы в онтогенезе млекопитающих с позиций теории функциональных систем, дано подробное описание внутриутробного периода развития, рассмотрены критические периоды эмбрионального развития крысят, связанные с закладкой и созреванием регуляторных систем организма. Автор также приводит имеющиеся в настоящий момент сведения о влиянии гестационного стресса на систему «мать-плод» в контексте экспрессии соответствующих генов с учетом полового диморфизма, что может модулировать реакции плода на внешние стимулы и определяет возможность фетального программирования. Результатом аверсивного вмешательства в процесс развития плода являются нарушения метаболических процессов, работы иммунной системы и поведения животных на разных стадиях постнатального развития. В обзоре представлены современные представления о работе гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и ее вероятной роли в модуляции физиологических и иммунных процессов, лежащих в основе предрасположенности потомства к развитию соматических и психических патологий. Подчеркивается роль цитокинов в синаптической дисфункции плода, что нарушает дифференцировку клеток и формирование нейронных связей. Обсуждаются гипотезы о возможных клеточных и биохимических механизмах развития стойких нарушений поведения потомства, подвергнутого внутриутробному стрессу. В целом, обзор достаточно полно знакомит читателя с современным уровнем развития проблемы и освещает малоизученные аспекты темы. Обширный фактический материал, представленный в данной главе, 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 – «открытое поле» для характеристики локомоторной и исследовательской активности и «приподнятый крестообразный лабиринт» для оценки тревожноподобного поведения, а также современный иммуноферментный анализ для определения уровня провоспалительного и противовоспалительного цитокинов. Для метаболического фенотипирования животных применяли метод непрямой калориметрии. Корректное использование методик подтверждает высокую научно-квалификационную подготовку диссертанта.

Результаты экспериментов и их обсуждение изложены на 65 страницах и содержат данные, свидетельствующие о том, что пренатальный стресс, вызванный ежедневным плаванием самок в холодной воде на второй неделе беременности, приводит к



нарушениям двигательной и исследовательской активности и сдвигам уровня тревожности на разных сроках постнатального онтогенеза у потомков обоего пола. Отмечены особенности этих изменений у самцов и самок, подвергнутых раннему стрессированию. Показаны изменения метаболических показателей и уровня провоспалительного и противовоспалительного цитокинов в периферической крови, сопровождающих нарушения поведения. Автор также приводит результаты корреляционного анализа, демонстрируя некоторые особенности взаимосвязей между физиологическими, иммунными и поведенческими показателями у крыс после внутриутробной стрессорной нагрузки. Обсуждая полученные результаты, автор сопоставляет собственные данные с данными других исследователей, изучавших влияние материнского стресса на организм потомства, уделяя большое внимание половой специфичности наблюдаемых нарушений. Завершается диссертация обоснованными выводами, отражающими основное содержание работы в полном соответствии с поставленными задачами. Текст написан хорошим литературным языком, практически без опечаток, читается легко и с интересом.

### **Научная новизна**

В диссертационной работе А. С. Мартюшевой получены приоритетные данные, свидетельствующие о том, что внутриутробная стрессорная нагрузка, вызванная плаванием самок в холодной воде во втором триместре беременности, приводит к нарушению поведения потомства. Оценка показателей двигательной и исследовательской активности, а также тревожноподобного поведения выполнена на животных в разные периоды постнатального онтогенеза. Установлено, что двигательная активность пренатально стрессированных крыс в условиях ярко освещенного открытого поля снижена по сравнению с контролем на 21-е сутки жизни. Однако на более поздних сроках наблюдения (30 и 60 сутки) индекс активности крыс опытной группы увеличивается, достигая контрольных значений и в тенденции даже превышая их на 60-е сутки. Впервые показано, что скорость восстановления двигательной активности у самок выше, чем у самцов.

Получены приоритетные данные о поло-возрастной специфике изменений показателей тревожноподобного поведения пренатально стрессированного потомства: выявлены разнонаправленные изменения уровня тревожности по показателям теста «приподнятый крестообразный лабиринт». Самцы опытной группы демонстрировали снижение уровня тревожности, наиболее выраженное у двухмесячных крыс. Напротив, самки показали повышенный уровень тревожности в возрасте 21 и 30 дней. В возрасте 2 мес. у стрессированных самок не обнаружено повышения исследовательской активности, характерного для самок соответствующей контрольной группы.

Очень интересны принципиально новые данные по модуляции интенсивности обменных процессов у животных, подвергнутых аверсивному воздействию в утробе матери. У самцов опытной группы объемы потребления кислорода, выдыхания углекислого газа и уровень тепловыделения снижаются в более ранние сроки, чем у контрольных животных. У подопытных самок динамика этих показателей не отличается от контроля.

Впервые выявлены особенности иммунных отклонений по показателям уровня про- и противовоспалительных цитокинов в периферической крови у потомства стрессированных беременных самок. Гестационный стресс не влиял на уровень провоспалительного цитокина ИЛ-6, однако сопровождался снижением концентрации противовоспалительного цитокина ИЛ-4 у самцов в возрасте 30 дней, у самок – в возрасте 21 день. Кроме того, пренатально стрессированные самки, в отличие от самцов, характеризуются отсутствием возраст-зависимого уменьшения содержания ИЛ-4, которое наблюдалось в контроле. Показано, что внутриутробный стресс у крыс приводит к изменениям связей между иммунными, метаболическими и поведенческими параметрами,

характер и направленность которых зависит от пола потомства и периода постнатального онтогенеза. Вызванные пренатальным стрессорным воздействием изменения изученных физиологических показателей проявляются в наибольшей степени в относительно ранние периоды постнатального онтогенеза и более выражены у самок животных по сравнению с самцами.

### **Научно-практическая значимость**

Диссертационное исследование А. С. Мартюшевой расширяет современные представления о влиянии пренатального стресса на двигательную и эмоциональную сферу животных разного пола в подростковом и взрослом возрасте, а также о физиологических механизмах, лежащих в основе нарушений поведения. Используемая в работе модель раннего стрессирования дает возможность изучения механизмов отдаленных последствий аверсивного воздействия в период внутриутробного развития млекопитающих на функционирование нервной системы и появления патологических симптомов – развитие признаков тревоги, изменение двигательной и исследовательской активности. Такой подход предполагает различные модификации и перспективен для практического использования в лабораторной практике моделирования психопатологических и соматических нарушений в научно-исследовательских институтах соответствующего профиля.

Значимыми представляются результаты, свидетельствующие об изменении метаболических и иммунных показателей в подростковом возрасте у самцов и самок крыс, подвергнутых пренатальному стрессу, исследование А. С. Мартюшевой вносит вклад в развитие представлений о роли провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в формировании стойких изменений поведения внутриутробно стрессированного потомства, что способствует более глубокому пониманию патогенеза такого рода нарушений. Результаты диссертационной работы А. С. Мартюшевой перспективны для разработки профилактических мероприятий по снижению негативных последствий гестационного стресса, а также методов коррекции (в том числе, комплексной патогенетической терапии) отдаленных последствий пренатального стресса.

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

Результаты получены в хорошо спланированном исследовании на достаточной выборке животных (96 крыс обоего пола). Используются адекватные тесты для оценки выбранных аспектов поведения, позволяющие судить о динамике локомоторной и исследовательской активности, также об изменении уровня тревожности на разных этапах постнатального развития животных, подвергнутых внутриутробному стрессированию. Применение современных методов анализа метаболических процессов и показателей функциональной активности иммунной системы у крыс подросткового и раннего взрослого возраста дает возможность выдвинуть гипотезы о физиологических и биохимических механизмах стойких нарушений соматических и психических процессов у пренатально стрессированных животных разного пола. Статистическая обработка данных выполнена с применением современных методов биометрики. Итоги работы сомнений не вызывают, степень достоверности и обоснованности научных положений и выводов высокая.

### **Полнота публикаций диссертационного исследования**

По результатам исследования опубликовано 11 научных работ, в том числе 4 статьи 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 А.С. Мартюшева является первым автором. Результаты работы обсуждались на нескольких научно-практических

конференциях (как всероссийских, так и с международным участием). 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 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 пренатальный стресс моделировали путем ежедневного помещения беременных самок в воду  $t 10^{\circ}\text{C}$  на 5 мин. Автор ссылается на работу Володиной и соавт., где сходная методика применялась в качестве острого стресса (в течение одного дня). В обсуждении приводятся работы с использованием длительного холодового воздействия, однако параметры значительно более жесткие (содержание самок при  $4^{\circ}\text{C}$ ). В литературе есть данные о том, что повторное применение одного и того же стрессора приводит к адаптации беременных самок (Melia et al., 1994, Dhabhar et al., 1997, Fride et al., 1997). Есть ли какие-то сведения о том, каким образом это может отражаться на развитии потомства?

2) Стандартное представление данных в тесте «открытое поле» предполагает учет длины пробега и, опционально, скорости перемещения животных для оценки горизонтальной (локомоторной) активности, а также учет количества стоек для оценки вертикальной (исследовательской) активности. Кроме того, есть возможность оценить уровень тревожности в этом тесте по поведению крыс в центре и на периферии арены. Все эти параметры регистрировались, как указано в соответствующем разделе методики, однако в работе приведены интегральные расчетные показатели – индексы активности, отражающие «ориентировочную поведенческую реакцию на новую обстановку (эффект новизны)». Насколько обосновано применение этого показателя? И что можно сказать о локомоторной активности крыс разного возраста и пола, подвергнутых пренатальному стрессированию (можно ли, например, говорить о формировании гипо- / гиперактивного фенотипа)?

3) Известно, что надежность корреляционного анализа зависит от размера выборки. В данном случае, это небольшие группы. Насколько оправдано применение этого способа анализа данных? И в целом, что дает определение корреляционных связей между показателями поведения крыс внутри одного теста (например, в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»: ряд параметров в этом тесте предполагает наличие взаимосвязи, если крыса больше времени проводит в закрытых рукавах, то меньше – в открытых...)?

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

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Мартюшевой Анны Сергеевны ««Возрастные и половые особенности физиологических показателей у крыс после пренатального стресса», является самостоятельной, завершенной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи в области физиологии человека и животных, а именно изучения особенностей поведения самцов и самок крыс, перенесших пренатальный стресс, и ассоциированных с этими паттернами изменений метаболических процессов и показателей нейровоспаления на разных этапах постнатального онтогенеза. 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 от 18.03.2023 г., 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

«04» сентября 2023 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

