

**Отзыв официального оппонента
на диссертацию Анисимовой Маргариты Владимировны на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.03.01 - физиология
"Влияние антигенной стимуляции самцов мышей на их репродуктивную
эффективность и морфофизиологические характеристики потомков"**

Диссертация Маргариты Владимировны Анисимовой посвящена изучению все еще мало исследованной области - иммунофизиологической регуляции мужской репродуктивной функции. Диссертация представляет собой результат поэтапной реализации хорошо спланированной, методологически продуманной исследовательской программы с ясно сформулированной целью, четкими задачами, адекватно подобранными и успешно примененными методами. Исследование выстроено на основе хорошего научного базиса. Все это дало возможность автору получить интересные взаимодополняющие результаты в полном соответствии с поставленными задачами. Текст диссертации, написанный хорошим, что нечасто случается, научным языком очень облегчает восприятие материала. Работа вызывает интерес с первых страниц.

Центральная проблема, которую исследует автор в диссертации, - выяснение отдаленных, на уровне потомков первого поколения, последствий системной активации адаптивного иммунитета самцов двух лабораторных линий мышей. Вопрос, может ли отцовский опыт, полученный при антигенной стимуляции иммунной системы, передаваться потомству, исследован путем анализа репродуктивных последствий покрытия самок антиген-стимулированными и контрольными самцами. Конкретно было изучено влияние системной активации иммунитета самцов на параметры сперматозоидов в динамике иммунного ответа, репродуктивный потенциал самцов (способность к фертильным спариваниям), пренатальное развитие, постнатальное выживание и фенотип их взрослых сыновей (параметры иммунного и эндокринного реагирования на введение иммуногенного белка KLH: антителообразование, индексы масс главных иммунокомпетентных органов - тимуса и селезенки, уровень тестостерона, наконец индексы андрогензависимых органов).

Диссертация начинается ведением, которое включает обоснование актуальности, постановку цели, задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, положения выносимые на защиту, перечисление использованных методов, личный вклад автора, апробацию результатов выступлениями с докладами и публикации. Все эти разделы не вызывают возражений. Каждая задача соответствует одному из трех последовательных этапов исследования: изучение эффектов иммунизации у самих самцов-производителей, у покрытых ими самок на этапе зачатия и в период беременности, и, наконец, у самцов-потомков иммунизированных отцов. Эта последняя задача - центральная во всем исследовании. Научная новизна исследования для меня несомненна. Все полученные результаты новы. Важнейший из них - положительное эпигенетическое влияние на самцов-потомков иммунизации нереплицируемым антигеном их отцов. Положения, выносимые на защиту хорошо сформулированы, вытекают из поставленных задач и в дальнейшем подтверждаются полученными результатами. Эти результаты опубликованы в 7 статьях, из которых 5 на английском языке, из них 4 - в журналах с высоким рейтингом 1-й четверти. Диссертация апробирована выступлениями на трех международных конференциях. Текст диссертации изложен на 140 стр. стандартного формата, содержит 19 рисунков и 11 таблиц. Список литературы включает 279 источников, из которых 274 иностранных.

Разбор диссертации по главам. Во введении, обосновывая актуальность всего исследования, Маргарита Владимировна обращается к теории жизненных циклов и результатам исследований адаптивных стратегий воспроизводства в условиях высоких паразитарных нагрузок и высокого разнообразия паразитов в природе. Автор исходит из того, что в популяциях, обитающих в условиях обилия паразитов, имеет место высокая вероятность покрытия на фоне активации механизмов иммунной защиты, несмотря на то, что на поведенческом уровне реализуется стратегия, уменьшающая вероятность полового контакта с инфицированным партнером. Думаю, что здесь имело бы смысл сказать о том, что в природных популяциях реализуется принцип конфликта полов (разнонаправленных репродуктивных стратегий самцов и самок). При высоких паразитарных нагрузках самцы стремятся максимизировать свою репродуктивную эффективность, в то время как самки напротив - снизить возможность заражения через активное избегание инфицированных самцов. Также имело бы смысл подчеркнуть, что реализуемый подход представляет собой экспериментальную модель, которая может претендовать лишь на аналогию с ситуацией в природе. В этом смысле выводы, получаемые при моделировании покрытия самок иммунизированными нереплицированным антигеном самцами в эксперименте всегда требуют осторожности при экстраполяции на природные сообщества.

Первая глава диссертации - подробный, хорошо структурированный обзор тщательно отобранной современной литературы. Рассмотрено размножение в условиях паразитарного пресса, обсуждается негативное влияние болезней на репродуктивные характеристики полов, реакция здоровых особей на инфицированных партнеров, обсуждаются свидетельства положительных эффектов в условиях высоких паразитарных нагрузок и высокого разнообразия паразитов, противоречивые эффекты антигенной стимуляции на процесс беременности. В следующем большом разделе обзора подробно описано и проанализировано влияния факторов эякулята самцов на репродуктивный тракт самки в до- и послеимплантационный период, влияние на процесс зачатия, имплантацию, развитие (эпигенетическое программирование) эмбриона. Подробное описание и анализ молекулярных механизмов может на первый взгляд показаться избыточным. Однако, в дальнейшем понимаешь его важность как молекулярного базиса всей программы исследований автора. Обзор литературы занимает почти третью часть текста всей диссертации (30 страниц), написан хорошим научным языком и свидетельствует помимо необходимой демонстрации знания научной литературы по данной и смежным тематикам о высоком образовательном базисе соискателя.

Вторая глава диссертации - Материал и методы. Охарактеризованы животные и условия их содержания. Безусловное преимущество исследования - тщательно контролируемые условия эксперимента в СПФ виварии Центра генетических ресурсов лабораторных животных. Строго контролируемая среда, стерильные условия содержания животных, их полная защищенность от инфекционных агентов извне и внутренних паразитов позволили проводить исследование, максимально сократив вклад в общую вариацию исследуемых признаков неконтролируемых факторов.

Далее в отдельных разделах приведены данные о размере опытных и контрольных групп в разных экспериментах - влияние антигенной стимуляции мышей разных линий на характеристики сперматозоидов, влияние иммунизации самцов линии C57BL/6 на репродуктивный успех и беременность, влияния иммунизации отцов на фенотип взрослых потомков. Собственно методы включают описания принципов и процедур протонной магнитно-резонансной спектроскопии, процедуры иммунизации и определения специфических к гемоцианину иммуноглобулинов (IgG), методов исследования сперматозоидов, иммуноферментного анализа (ELISA) гормонов и цитокинов, наконец, описаны статистические методы, использованные при анализе результатов.

Из вопросов, которые возникают при чтении этой главы назову следующие.

Я не понял, в какой форме вводили внутривбрюшинно мышам KLH. В одном месте написано "100 мкл на самца" иммуногенного белка KLH, а двумя строчками ниже "в дозе 50 мкг/мышь".

Ссылаясь на данные других авторов, автор пишет, что 6 дней с начала контакта с самцом достаточно для достижения эструса всеми самками. Но действительно ли у всех самок в эксперименте автора был достигнут эструс? Могли быть самки, которые не пришли в состояние эструса. Учитывали ли такую возможность при сравнении эффективности покрытия самок опытными и контрольными самцами?

Какими статистическими программами пользовался автор при расчетах статистических показателей?

Применяя дисперсионный анализ, автор использует LSD test для апостериорных сравнений. Это очень мягкий тест для коррекции эффекта множественных сравнений, он плохо контролирует ошибку первого рода. Поэтому надежнее было бы использовать поправку Бонферрони на множественность сравнений, но это могло бы означать снижение статистической значимости результатов сравнения.

Третья глава - результаты исследования. Глава разбита на несколько разделов с иерархически организованной рубрикацией в соответствии с планом всего исследования. Результаты изложены на 34 стр. текста, включая таблицы и рисунки.

Первый раздел - "Влияние антигенной стимуляции на характеристики сперматозоидов двух линий мышей, отличающихся преобладанием провоспалительного и противовоспалительного типов иммунного реагирования". Раздел разбит на два подраздела. Первый из них посвящен сравнению динамики адаптивного иммунного ответа самцов линий C57BL/6 и BALB/c на введение KLH, другой - сравнению параметров сперматозоидов в ходе развития иммунного ответа у самцов двух линий. Автор убедительно демонстрирует различия между линиями в динамике адаптивного ответа на KLH (у самцов линии C57BL/6 более выраженная иммунная реакция на антиген, более высокое число и подвижность сперматозоидов). При этом в обеих линиях наблюдается снижение концентрации и доли подвижных сперматозоидов только на самой ранней стадии антителиобразования. Результаты, изложенные в первом разделе результатов, в принципе ожидаемы и отчасти подтверждают известное для мышей C57BL/6. Наиболее интересны статистически значимая корреляция уровня тестостерона с индивидуальными характеристиками сперматозоидов у мышей C57BL/6 и отчетливо показанная зависимость влияния иммунизации на число, форму и подвижность сперматозоидов от времени у самцов этой линии. Полученными результатами обоснован выбор линии C57BL/6 в качестве модельной для дальнейших исследований.

Из недостатков первого раздела результатов назову лишь неудачное расположение маркеров уровня статистической значимости различий на рисунке 1 (непонятно, относятся звездочки к межлинейному или внутрелинейному сравнению). Думаю, что все-таки следовало бы привести в таблице 2 статистические оценки для внутрелинейных сравнений уровня тестостерона у иммунизированных и контрольных самцов.

Следующий раздел результатов посвящен исследованию влияния иммунизации самцов линии C57BL/6 на репродуктивный успех и беременность. Автор показывает, что уровень анти-KLH IgG в плазме крови имел положительную корреляцию с уровнем анти-KLH IgG в семенной жидкости. Уровень анти-KLH IgG в семенной жидкости положительно коррелировал с уровнем тестостерона в плазме крови. При этом уровень тестостерона в плазме крови рос у иммунизированных самцов лишь после спаривания. Результат непараметрического ANOVA свидетельствует в пользу взаимодействия факторов иммунизации и спаривания. Хотя уровень статистической поддержки каждого из факторов формально значим, для уверенного суждения о самостоятельном эффекте каждого из факторов на мой взгляд он все-таки довольно низок. Я не понял, что происходит с тестостероном в семенной жидкости, есть ли связь уровня тестостерона в плазме крови и в семенной жидкости. Об этом ничего не сказано.

Читая текст о влиянии иммунизации самцов линии C57BL/6 на фертильную способность, беременность и пренатальное развитие потомков, не сразу удается понять как оценивался показатель кумулятивного роста числа потомков. Он рассчитывался как доля потомков, зачатых за первые два дня содержания с самками. Следовало сразу указать по отношению к чему рассчитывалась доля. Только полноценное объяснение в подписи к рисунку 9 все расставляет на свои места. Также отмечу, что доля и процент не совсем одно и то же. Если в тексте речь о долях, то и численное выражение в скобках следует приводить в долях, а не в процентах.

Наиболее интересный результат этого раздела - большой репродуктивный успех на стадии зачатия прошедших иммунизацию самцов, имевших также более высокий уровень анти-KLN IgG в плазме крови и семенной жидкости. Общее количество потомков, зачатых иммунизированными самцами, высоко значимо коррелировало с уровнем анти-KLN IgG в семенной жидкости. Важным результатом является также то, что совместное содержание и спаривание самцов с самками сопровождалось статистически значимым ростом уровня тестостерона у иммунизированных самцов не только в плазме крови, но и в амниотической жидкости. Автор приводит также результаты корреляции индивидуальных различий в иммунных реакциях самцов на инъекцию KLN с массой плаценты, с фетоплацентарным индексом и с анти-KLN IgG в семенной жидкости. Коэффициенты корреляции имеют статистически значимую поддержку. Однако эти последние результаты, я думаю, следует интерпретировать с осторожностью - при низкой величине коэффициента корреляции (от 0.28 до -0.21) статистическая значимость связи обусловлена большим размером выборки ($n=108$).

В подразделе о влиянии иммунизации самцов линии C57BL/6 на постнатальное развитие показан более высокий процент гибели потомков самок, покрытых контрольными самцами. Большая масса потомков в контроле при повышенной смертности в подсосный период легко объяснима, поскольку выжившие детеныши получают больше родительской заботы и пищи. В обоих случаях формально результат значим, но уровень значимости безошибочного прогноза не высок, остается лишь немногим ниже 5% порога. Это, несколько не умаляет значение полученных результатов на малых выборках, но служит поводом для их проверки в дальнейших исследованиях.

На рис. 12 нет единообразия в обозначении маркерами уровней статистической значимости. Это касается и некоторых других рисунков. Также не совсем понятно, почему на рис. 12 Б приведен результат сравнения по t -критерию Стьюдента, а на том же рисунке, пункт В, показан результат сравнения не по t -критерию для независимых выборок, а приведена F статистика из ANCOVA.

Наконец в последнем разделе результатов рассмотрено влияние иммунизации самцов линии C57BL/6 на фенотип уже взрослых потомков. Это, пожалуй, самая интересная часть результатов. Здесь автор анализирует спектры нейромедиаторов в коре и миндалинах мозга у подросших самцов-потомков иммунизированных и контрольных отцов, исследует адаптивную иммунокомпетентность самцов-потомков, влияние иммунизации потомков контрольных и иммунизированных самцов на уровень тестостерона, массы андрогензависимых органов и характеристики сперматозоидов.

Спектры нейрометаболитов мозга анализировались современным быстро развивающимся методом протонной магнитно-резонансной спектроскопии. Убедительно показано, что потомки иммунизированных самцов имели более низкие уровни гамма-аминомасляной кислоты и некоторых других метаболитов, но более высокие уровни глутамата/глутамина в амигдале, что свидетельствует о сдвиге в сторону возбуждающих нейрометаболитов, играющих важную роль в формировании профиля социального и полового поведения... В целом в этом последнем разделе результатов убедительно показано, что потомство иммунизированных отцов демонстрирует способность в равной степени поддерживать как иммунные, так и андроген-зависимые признаки, в то время как потомки контрольных отцов снижали свои репродуктивные возможности в ответ на

антигенную стимуляцию. Спаривание самок с иммунизированными самцами оказывает модулирующее влияние на фенотипические признаки взрослых потомков, включая нейрометаболизм и иммунно-эндокринное реагирование на антигенную стимуляцию.

Из мелких замечаний к этому разделу назову следующие. Приводя в тексте значения, характеризующие уровни возбуждающих (глутамат/глутамин) и тормозных (ГАМК) нейрометаболитов в амигдале, автор забывает указать размерности. На рис. 13 приведен пример получаемого спектра МРС без расшифровки показанных на нем пиков нейрометаболитов. Хотелось бы видеть конкретную спектрограмму с указанием на ней места глутамата/глутаминна и гамма-аминомасляной кислоты. На рисунке 19 непонятно представлен результат статистического сравнения. Статистически значимым на уровне $p < 0.05$ для двух характеристик подвижности сперматозоидов (VAP и VSL) было влияние взаимодействия факторов «группа потомства» и «иммунизация». Что означает на Рис. 19 $p < 0.01$?

Завершая разбор главы подчеркну, что все сделанные мной замечания несколько не умаляют положительного впечатления от проделанной работы и ее результатов.

Глава "Обсуждение" посвящена критическому разбору полученных результатов в сопоставлении с имеющимися в этой области результатами других исследователей и коллектива, в котором работает Маргарита Владимировна. В целом полученные результаты хорошо согласуются имеющимися сведениями, подтверждая их, дополняя и, в значительной степени, обогащая научное направление новыми данными. Обсуждение написано хорошим языком, достаточно лаконично, читается с большим интересом и не вызывает вопросов.

Диссертация заканчивается заключением и выводами. Заключение суммирует важнейшие результаты уже с учетом обсуждения в предыдущей главе, что очень уместно. Отцовский опыт, обусловленный активацией системного иммунитета нереплицируемым антигеном KLH, влияет на программу развития потомков. Это влияние прослеживается на всех этапах процесса воспроизводства. Этот результат хорошо согласуется с данными полученными ранее и другими исследователями. Подводя итог всему исследованию автор вполне логично обращает внимание на возможный эволюционный аспект полученных результатов - спаривание самок с антиген-стимулированными партнерами в период максимального антителообразования может оказывать положительное влияние на репродуктивный успех самки и, как следствие, способствовать стабильному существованию вида в условиях устойчиво высокого паразитарного пресса. Здесь, мне кажется, все-таки, следовало бы сделать оговорку. Я уже отмечал это в начале (введение). Маргарита Владимировна исследует лабораторную модель, которая в своем экспериментальном дизайне может претендовать на аналогию с обитающими в условиях высокого паразитарного давления популяциями, но не моделирует природную ситуацию (условия существования) к которой апеллирует автор. В этом смысле выводы, получаемые при экспериментальном моделировании покрытия самок иммунизированными KLH самцами требуют осторожности при экстраполяции их на природные сообщества.

Выводы диссертации лаконичны, хорошо сформулированы, в полной мере отражают полученные на каждом из этапов исследования результаты.

В целом диссертация Маргариты Владимировны Анисимовой производит впечатление полноценного, выполненного на современном научном уровне диссертационного исследования. Полученные результаты и их интерпретация не вызывают сомнений. Не очень высокие уровни статистической значимости некоторых результатов не умаляют их ценности, а с учетом новизны проблемы должны стимулировать исследователей для независимых проверок, что в современных биологических науках признается обязательным для окончательных выводов. Материалы диссертации М.В. Анисимовой опубликованы в ведущих высокорейтинговых научных журналах, что служит свидетельством высокого уровня квалификации их автора. Автореферат диссертации

написан в полном соответствии с основным текстом и верно отражает все сказанное в диссертации.

Считаю, что диссертация Маргариты Владимировны Анисимовой "Влияние антигенной стимуляции самцов мышей на их репродуктивную эффективность и морфофизиологические характеристики потомков", представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 - физиология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям ВАК, а ее автор, Анисимова Маргарита Владимировна, достойна присуждения искомой степени.



Роговин Константин Александрович, в.н.с., д.б.н.

16.02.2022 г.,

Институт проблем экологии и эволюции им.

А.Н. Северцова РАН, Москва 119071,

Ленинский проспект 33

Адрес эл. почты: krogovin@yandex.ru



Подпись Роговина КА
Заверяю, зав. канц. ИПЭЭ РАН Шел
" 16 " 02 2022 г.