

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета Крылова Бориса Владимировича на диссертацию Евгения Александровича Цветкова «Механизмы пластичности синаптической передачи и их роль в формировании амигдала-зависимого поведения», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук Санкт-Петербургского государственного университета по специальности 03.03.01 физиология.

Диссертационное исследование Е.А.Цветкова посвящено важной и активно разрабатываемой в мировой литературе теме, направленной на исследование синаптических механизмов формирования амигдала-зависимых условно-рефлекторных реакций страха. Работа фокусируется на изучении механизмов синаптической передачи в сенсорных синапсах амигдалы, формируемых афферентами из таламуса и коры, а также функциональной роли их пластичности при формировании амигдала-зависимых реакций, связанных с проявлением страха. Положительной особенностью работы является используемый автором комплексный подход, который объединяет в себе самые современные электрофизиологические, генетические и поведенческие методы исследования. Успешность данного подхода заключается в том, что с его помощью автору работы удалось глубоко изучить механизмы синаптической передачи в кортико- и таламо-амигдаларных синапсах амигдалы, оценить характеристики инициации, развития и регуляции долговременной потенциации, исследовать модулирующую роль ГАМК_Aергических нейронов, белков GRP и статмина, а также выяснить роль пластичности сенсорных синапсов амигдалы в формировании условно-рефлекторных поведенческих реакций, возникающих при предъявлении аверсивных стимулов. **Актуальность** этих исследований, несомненно, высока, поскольку в работе приводятся ответы на те вопросы, которые интересуют широкий круг исследователей, выясняющих молекулярные механизмы формирования поведенческих реакций. В первую очередь это относится к новым данным, полученным автором, которые проясняют особенности механизмов формирования условно-рефлекторных реакций страха, т.е. той эмоции, которая может проявляться не только в качестве симптома многих патологических состояний, но и являться их причиной.

09/2-69 от 10.05.2018

Научная новизна исследования. В работе исследованы электрофизиологические свойства и особенности медиаторной передачи в синапсах, которые формируются сенсорными афферентами этой структуры, идущими из слуховой коры и таламуса. Показано, что механизм долговременной потенциации медиаторной передачи в этих синапсах имеет пресинаптическую природу и опосредован увеличением вероятности выброса медиатора из пресинапса. Обнаружено, что кортикальные и таламические влияния на проекционные клетки дорсолатерального ядра амигдалы находятся под разной степенью контроля со стороны тормозных интернейронов. Впервые доказано, что причиной этого явления является большая эффективность глутаматергических синапсов, которые формируются на интернейронах афферентами из таламуса. Подобная асимметрия тормозных процессов приводит, в частности, к тому, что параметры долговременной потенциации (ДВП), инициированной на кортико- или таламо-амигдалярных афферентах, проявляют различную чувствительность к ГАМКергической модуляции. Принципиальной новизной отличаются данные, полученные при изучении регуляторной роли ионов кальция в инициации ДВП. Впервые показано, что высвобождаемый из внутриклеточного депо кальций не является фактором инициации ДВП и не влияет на ее параметры, в то время как кальций, поступающий через трансмембранные кальциевые каналы, играет первостепенную роль в этих механизмах. Особую роль здесь играют NMDA-рецепторы, несущие NR2B-субъединицу, и потенциал управляемые кальциевые каналы L-типа.

Сравнение параметров ДВП контрольных животных и животных после выработки условно-рефлекторного страха (обучения) позволило впервые описать феномен окклюзии ДВП. Этот феномен подтверждает представление о том, что процесс обусловливания сопровождается пластическими преобразованиями синапсов. Установлено, что механизмы пластических процессов, запускаемых обучением, сходны с механизмами, запускаемыми при искусственной инициации ДВП. Изучение специфичности долговременной потенциации кортикальных и таламических входов в амигдалу позволило впервые описать феномен гетеросинаптического переноса ДВП и доказать, что он регулируется механизмом обратного захвата медиаторов и зависит от выраженности (интенсивности) спилловера.

Сравнительное исследование контрольных животных и животных, нокаутных по генам статина или GRP, позволило впервые установить, что эти

белки влияют как на параметры ДВП кортико- и таламо-амигдалярных синапсов амигдалы, так и на амигдала-зависимое поведение животных.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты имеют существенное значение для понимания нейронных механизмов формирования амигдала-зависимых условно-рефлекторных реакций страха. Работа расширяет имеющиеся представления о принципах сенсорной афферентации амигдалы и о функциональной организации межнейронных синаптических связей в этой структуре позвоночных животных. Сочетание электрофизиологического, генетического и поведенческого подходов в исследовании позволило выявить, что долговременная пластичность сенсорных синапсов амигдалы является одним из элементов пластических изменений, которые происходят в синапсах при развитии амигдала-зависимых условно-рефлекторных реакций. Данный феномен имеет как теоретическую, так и практическую значимость. Теоретический аспект обусловлен тем, что материалы работы вносят важнейший вклад в понимание имеющихся представлений о формировании условно-рефлекторных реакций страха и лежащих в их основе механизмов синаптической пластичности. Прикладной аспект обусловлен тем, что материалы работы могут использоваться не только для понимания механизмов регуляции амигдала-зависимых условно-рефлекторных реакций, но и для применения этих знаний в клинической практике при разработке новых антидепрессантов.

Общая характеристика работы. Диссертация изложена на 339 страницах, включая представленное на английском языке резюме диссертации на 50 страницах. Диссертация содержит 2 таблицы, 36 рисунков. Список литературы включает 243 источника, в том числе 13, работ, опубликованных на русском языке, и 230 – на английском. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, трех глав (в главе три представлены четыре раздела собственных данных и их обсуждения), заключения, выводов и списка публикаций автора, списка тезисов его докладов, списка цитированной литературы, перечня сокращений, списка иллюстраций. Все иллюстрации высокого качества,

первичные записи экспериментальных данных демонстрируют достоверность полученных результатов. Статистическая обработка выполнена грамотно. Работа написана хорошим литературным языком.

Во введении обоснована актуальность темы, четко формулируются цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, аргументировано доказывается новизна исследования, его теоретическая и практическая значимость.

Глава «**Обзор литературы**» состоит из шести разделов. Автор тщательно анализирует данные литературы о физиологических механизмах формирования страха и структурах мозга, которые участвуют в его обеспечении. Подробным образом рассматривается амигдала, структура конечного мозга, которая играет ключевую роль в формировании амигдала-зависимых условно-рефлекторных реакций, связанных с проявлением страха. Анализируются афферентные и эфферентные связи амигдалы. Особое внимание уделяется рассмотрению дорсолатерального ядра этой структуры. Рассматриваются механизмы пластичности синапсов дорсолатерального ядра амигдалы и их возможная роль в механизмах формирования амигдала-зависимых условно-рефлекторных реакций. Приведенный материал убедительно обосновывает цель работы – выяснение функциональной роли долговременной потенциации синапсов амигдалы в формировании условно-рефлекторных реакций страха, изучения механизмов ее обеспечения и регуляции, в том числе и со стороны ГАМКергических нейронов и белков GRP и статина.

В целом, аналитический обзор литературы дает полное представление о современном состоянии изучаемой проблемы, демонстрирует необходимый уровень критичности, свидетельствует о широком научном кругозоре автора, что позволило ему четко сформулировать задачи диссертационного исследования.

В разделе «**Материалы и методы исследования**» приводится подробное описание использованной аппаратуры и примененных методов исследования, которые соответствуют самым высоким мировым стандартам. Подробно разъясняются все этапы проведенных экспериментов и методы их статистической обработке. Эксперименты проводились на крысах (массой до 100 г) линий *Wistar*

или *Sprague Dawley* и мышах нормального генотипа и нокаутов по генам статмина или GRP-рецепторов.

В главе «**Экспериментальные исследования и обсуждение**» представлены результаты тщательно проведенных исследований. Автор логично сгруппировал полученные данные в четыре больших раздела с разбиением на более мелкие, посвященные описанию и анализу результатов исследований, что позволило выяснить молекулярные механизмы, лежащие в основе исследуемых поведенческих реакций. Это комплексное исследование заслуживает самой высокой оценки. Его успех достигнут благодаря совместному применению электрофизиологического, генетического и поведенческого подходов.

Первый раздел посвящен анализу параметров синаптической передачи в синапсах, которые формируются на проекционных клетках амигдалы афферентами из коры и таламуса. Описаны характеристики NMDA-, AMPA- и ГАМКергических компонентов синаптического ответа. Приводятся доказательства того, что информация, поступающая в амигдалу по таламическим афферентам, находится под более мощным контролем со стороны локальных ГАМКергических интернейронов. Следующий раздел посвящен анализу механизмов пластичности синаптической передачи в сенсорных синапсах амигдалы. Показано, что долговременная потенция этих синапсов обусловлена пресинаптическим механизмом и может быть объяснена увеличением вероятности выброса медиатора из пресинапса. В ходе анализа ДВП медиаторной передачи в синапсах амигдалы контрольных и экспериментальных животных (у последних вырабатывали условный аверсивный рефлекс) было показано, что ДВП является одним из элементов пластических изменений, которые происходят в синапсах амигдалы при формировании условно-рефлекторных реакций страха. Данный вывод подтверждается и в последующих главах, посвященных исследованию регуляторной роли белка статмина и гастрин-высвобождающего пептида.

В конце каждого раздела автор приводит анализ и обсуждение полученных данных, где в сжатом виде дается оценка наиболее значимых результатов работы, которые критически оцениваются и обсуждаются в сравнении с данными литературы. Такое обсуждение позволило автору сформулировать выводы, которые отличаются принципиальной новизной. Выводы затрагивают фундаментальные проблемы физиологии, они конкретны и целиком основаны на результатах собственных исследований автора.

В разделе «**Заключение**» Е.А. Цветковым оцениваются наиболее значимые результаты работы и на их основе формулируются выводы диссертации. Они основаны на результатах исследования, конкретны и обоснованы, способствуют решению ряда фундаментальных проблем физиологии.

Полученные результаты трудно переоценить, так как они расширяют представления о молекулярных механизмах формирования и регуляции условно-рефлекторных амигдала-зависимых реакций. Тем не менее, возникают следующие вопросы.

В разделе 2.1.7. (Регистрация трансмембранного тока и потенциала) автор подробно описывает используемую им методику локальной фиксации потенциала. Однако отсутствуют сведения о контроле последовательного сопротивления (R_s), что очень важно в этом случае. Очевидно, что токи, регистрируемые автором, довольно малы. Они не вызовут большой ошибки в определении стационарного значения мембранного потенциала. Но всё же, значение R_s стоило бы оценить, поскольку оно может оказать влияние на точность определения кинетических параметров, характеризующих ответы ионных каналов.

В разделе 3.2 при исследовании механизмов долговременной потенциации осуществлялась стимуляция кортикальных и таламических входов дорсолатерального ядра амигдалы. Можно ли с полной уверенностью сказать, что стимуляция одного из входов не сопровождается частичной стимуляцией волокон альтернативного входа?

Материалы диссертации апробированы на научных форумах, важнейшие положения в полной мере отражены в научных публикациях.

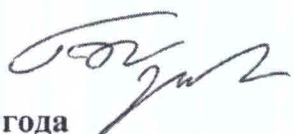
Рецензируемая диссертация является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, характеризующейся актуальностью, новизной и практической значимостью. Содержание диссертации соответствует поставленным задачам и подробно отражает последовательность их решения. Диссертация написана логичным, понятным языком, ее выводы достоверны и хорошо аргументированы.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

На основании изложенного считаю, что представленная диссертационная работа Цветкова Евгения Александровича «Механизмы пластичности синаптической передачи и их роль в формировании амигдала-зависимого поведения» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 01.09.2016 № 6821/1 "О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете", соискатель Цветков Евгений Александрович заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Член диссертационного совета Крылов Борис Владимирович.
Ученая степень: доктор биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология, ученое звание: профессор по специальности 03.03.01 – физиология, должность: заведующий лабораторией физиологии возбудимых мембран ФГБУН «Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН»

Подпись



Крылов Борис Владимирович

Дата: 10 мая 2018 года

Подпись заверено Старшим инспектор отдела кадров
Звезина А.Ю.

