



Российская Академия Наук

НОЗДРАЧЕВ

Александр Данилович

академик

Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 5
Тел. +7 812 3289741 Факс +7 812 3232454
E-mail: adn@infran.ru

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета 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

В большинстве развитых стран на фундаментальные исследования в том числе и в области физиологии или медицины выделяются огромные средства, составляющие порой до трети ВВП. Такое положение, отвечающее национальным интересам, в определенной мере стало возможным в результате последовательной реализации стратегий разработки новых высокоэффективных способов, методических приемов, научно-идеологических представлений и пониманий изучаемого существа. Приведение в действие этих стратегий проходит на фоне интенсивного развития нейрофизиологии, нейрохимии и, разумеется, оценки функциональной эффективности научного достижения. К последнему положению рассматриваемая работа имеет самое непосредственное отношение.

Всемирно признанная и авторитетная нейрофизиологическая школа С.-Петербургского университета с её достижениями в разработке механизмов нейрональных взаимодействий и клеточных ионно-мембранных процессов в своем развитии достигла весьма ощутимых результатов. Благодаря глубоко профессиональным поискам и экспериментальным разработкам одного из продолжателей этого направления – выпускника биологического факультета СПбГУ Е.А. Цветкова с энтузиастами-нейрофизиологами ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН и ряда американских лабораторий удалось установить многие доселе мало или совсем неизвестные механизмы отчетливо проявляющихся неврологических эффектов нескольких классов химических соединений, на основе которых могут быть разработаны и активно использоваться медикаментозные препараты широкого спектра действия. Несомненно, это большое достижение и успех, который следует отнести к фундаментальным аспектам нейрофизиологической науки, а также к её прикладным направлениям.

PK 09/2-65 от 07.05.18

В этой работе автору наряду с конкретными результатами экспериментального поиска удалось рассмотреть и реально значительно дополнить или поправить уже существующие теории, представления и взгляды на анализируемые механизмы сенсорных восприятий и проявлений. Всё это является хорошим примером, заслуживающим одобрения и похвалы. Разумеется, к подобной оценке следует непременно добавить и перспективу, которая столь же однозначно открывается при знакомстве с материалами работы, перспективу дальнейшего развития исследований особенно практического плана. На этом я как раз и *хочу сделать акцент в своих впечатлениях* от знакомства с диссертацией.

Среди разнообразных форм амигдала-зависимого поведения, наибольший интерес привлекает реакция страха. Кэрролл Изард (1980), известный исследователь этого феномена, определяет страх как базовую эмоциональную реакцию, которая неделима на составляющие и возникает в ситуации реальной или мнимой опасности с целью адаптации индивида к текущей ситуации. В отличие врожденных, страхи приобретенные являются результатом опыта, позволяют распознавать степень опасности и принимать меры для нейтрализации/минимизации воздействия неблагоприятных факторов. С нарушениями регуляции этого процесса связывают такие расстройства психики как фобии, панические расстройства, неврозы, посттравматические стрессовые нарушения, навязчивые страхи или хроническая тревожность как таковая.

Исследование страха возможно по различным аспектам его проявления: психологическом, философском, социальном, медицинском и др. Однако, для максимально эффективной их разработки, теоретического осмысления и практического использования результатов необходимо понимание нейронных механизмов, что определяет актуальность электрофизиологических исследований данного феномена. Именно этой проблеме посвящена диссертационная работа Е.А. Цветкова «Механизмы пластичности синаптической передачи и их роль в формировании амигдала-зависимого поведения».

Актуальность исследования Е.А. Цветкова определяется тем, что с помощью комплекса современных методических подходов – электрофизиологического анализа функции синапсов, условно-рефлекторных и генетических, были получены новые приоритетные данные. Впервые был установлен факт неравнозначности тормозных процессов, запускаемых кортико- и таламо-амигдаллярными входами. Установлено, что первостепенную роль в инициации долговременной потенциации (ДВП) играет кальций, поступающий именно через трансмембранные каналы, но не высвобождаемый из внутриклеточных депо. Сравнительное исследование параметров ДВП контрольных животных и животных после выработки условно-рефлекторного страха (обучения) позволило впервые детально рассмотреть и оценить феномен окклюзии ДВП. В результате изучение специфичности потенциации синапсов кортикальных и таламических афферентов амигдалы был *открыт феномен гетеросинаптического переноса ДВП*, доказано, что он регулируется механизмом обратного захвата медиаторов и зависит от интенсивности спилловера. Сравнительное исследование контрольных животных и животных, нокаутированных по генам статина или GRP, позволило впервые установить и, соответственно, доказать влияние определенных белков на выработку условнорефлекторной реакции страха и на параметры ДВП кортико- и таламо-

амигдалярных синапсов. Результаты проведенного исследования вносят весьма существенный вклад в понимание многих фундаментальных процессов работы мозга в целом, расширяют имеющиеся уже в нейрофизиологии представления о принципах функциональной организации межнейронных синаптических связей в центральных и периферических структурах соматической и автономной частях нервной системы позвоночных.

Диссертация Е. А. Цветкова оформлена по классическому принципу.

Во введении обоснована актуальность темы работы, далее формулируются цель и задачи исследования, аргументировано доказывается новизна исследования, его теоретическая и практическая значимость.

В представленном **обзоре литературы** на хорошем современном профессиональном уровне представлено обобщение последних свежих данных о морфофункциональных характеристиках амигдалярного комплекса, механизмах синаптической передачи, долговременной потенциации, как одного из механизмов, лежащих в основе формирования адаптивного поведения, условно рефлекторной деятельности. Анализ литературных материалов дает исчерпывающее представление о современном состоянии изучаемой проблемы, показывает хороший уровень критичности автора и свидетельствует о наличии широкого круга неисследованных вопросов и проблем. Обзор этот хорошо, логично и вполне убедительно обосновывает цель работы Е.А. Цветкова, которая заключается в изучении функциональной роли долговременной потенциации синапсов амигдалы при формировании условно-рефлекторной реакции страха, механизмов ее обеспечения и регуляции, а также конкретные задачи диссертационного исследования.

Раздел **«Материалы и методы исследования»** свидетельствует о сложном и хорошо продуманном дизайне работы. Приводится подробное рассмотрение использованной аппаратуры и примененных методов исследования: электрофизиологических с протоколами регистрации/инициации пластических изменений синаптической передачи, поведенческих тестов. Подробно разъясняются все этапы проведенных экспериментов и методы их статистической обработки. Приводится характеристика экспериментальных животных: крыс линий Вистар (*Wistar*) или Спрег-Доули (*Sprague-Dawley*), мышей нормального генотипа и нокаутов по генам статмина или GRP-рецепторов. Регистрация активности клеток осуществлялась методом пэтч-кламп (*patch-clamp*) в конфигурации «целая клетка» (*whole cell*). Для регистрации токов использовался режим фиксации потенциалов (*voltage clamp mode*), а для регистрации потенциала – режим фиксации трансмембранного тока (*current clamp mode*). Выработку аверсивных условных рефлексов автор осуществлял по классической методике сочетания условного и безусловного сигналов. В качестве критерия выработки условного рефлекса на первоначально индифферентный звуковой сигнал, было использовано изменение акселерометрического индекса (АИ) при вздрагивании крысы в ответ на подачу стимула. Для оценки параметров тревожности или врожденного страха использованы тесты «приподнятый крестообразный лабиринт», «реакция перехода», «открытое поле», оценку гиппокамп-зависимой памяти осуществляли в установке «водный лабиринт» Мориса. Тестирование болевой чувствительности проведено по методике Harrell.

Знакомство с методическим разделом оставило у меня превосходное впечатление от тщательности подбора, прецизионности, современности методов, соответственно, аппаратуры и условий проведения экспериментов.

В части работы «**Экспериментальные исследования и обсуждение**» изложены результаты экспериментов, проведенных на хорошем современном уровне. Весьма объемные экспериментальные данные удачно сгруппированы в четыре больших раздела с разделением на подглавы; и каждая последующая глава логично вытекает из результатов предыдущей. Что приятно читается и понятно воспринимается.

Первый раздел посвящен анализу параметров синаптической передачи в синапсах, которые формируются на проекционных клетках амигдалы афферентами из коры и таламуса. Рассмотрены и оценены характеристики NMDA-, AMPA- и ГАМК-ергических компонентов синаптического ответа. Приводятся доказательства (отчетливо и понятно) того, что информация, поступающая в амигдалу по таламическим афферентам, находится под более мощным контролем со стороны локальных ГАМК-ергических интернейронов. Долговременная потенция (ДВП) синапсов, образованных кортико- или таламо-амигдаларными волокнами на проекционных клетках дорсолатерального ядра амигдалы проявляют зависимость от поступления ионов кальция внутрь клетки. Основную роль в обеспечении этого процесса играют NMDA-рецепторы, содержащие NR2B-субъединицу, и потенциал-управляемые кальциевые каналы L-типа.

Во втором разделе проведен весьма убедительный анализ механизмов пластичности синаптической передачи на проекционных клетках дорсо-латерального ядра амигдалы. Результаты этой части работы отчетливо демонстрируют, что долговременная потенция (ДВП) этих синапсов обусловлена пресинаптическим механизмом и является преимущественно медиаторно-зависимой. Для подтверждения этого проведено сравнение потенции синапсов нейронов дорсо-латерального ядра амигдалы у контрольных и экспериментальных животных с выработанным условным аверсивным рефлексом. Именно этим подходом к вопросу Е.А. Цветкову удалось весьма убедительно продемонстрировать, что ДВП является механизмом пластических изменений, которые происходят в синапсах амигдалы при формировании условно-рефлекторных реакций страха, при этом пластические процессы, запускаемые обучением, сходны с таковыми при искусственной инициации ДВП. Этот принципиальный вывод, что на мой взгляд является исключительно важным достижением диссертанта, подтверждается и в последующих главах, посвященных исследованию регуляторной роли белка статина и гастрин-высвобождающего пептида. Изучение специфичности ДВП кортико- и таламо-амигдаларных синапсов позволило впервые рассмотреть и представить феномен гетеросинаптического переноса ДВП и доказать, что он регулируется механизмом обратного захвата медиаторов и зависит от интенсивности спилловера (эффекта избытка).

В двух разделах «Исследование роли гастрин-высвобождающего пептида и его рецептора в работе амигдалы» и «Исследование роли статина в работе амигдалы» Е.А. Цветковым проведён анализ функциональной роли гастрин-высвобождающего пептида и статина в механизмах медиаторной передачи в кортико- и таламо-амигдаларных синапсах.

GRP (gastrin-releasing peptide), как широко известно, представляет собой протеин, который в принципиальных нейронах мозга грызунов может выполнять функцию котрансмиттера глутамата, GRP селективно распознается специфичным рецептором. Известно также, что GRP-ген интенсивно экспрессируется в проекционных клетках специфического дорсо-латерального ядра амигдалы, но не в интернейронах и глии. При этом рецепторы к GRP характерны для ГАМК-эргических интернейронов. В поведенческих экспериментах автор диссертации установил, что нокаутирование гена GRP-рецепторов

сопровождается модификацией параметров амигдала-зависимого обучения и изменением параметров ДВП синапсов амигдалы; гиппокамп-зависимые формы обучения при этом не меняются. Полученные результаты позволяют сделать принципиальный вывод о том, что изменения поведения связаны с модуляцией пластических свойств амигдаларных синапсов, обусловлены изменением активности тормозных интернейронов у нокаутных животных. Альтернативные гипотезы о том, что изменения параметров амигдала-зависимого обучения могут быть связаны с изменением общей чувствительности мутантных животных к аверсивным стимулам или с изменением уровня их тревожности не подтверждены, поскольку поведенческие тесты - «приподнятый крестообразный лабиринт» и «реакция перехода» - не выявили различий ни в уровне чувствительности, ни в уровне тревожности. На этом основании автор заключает, что отсутствие Gpr-рецепторов приводит к снижению активности тормозных интернейронов амигдалы, что облегчает инициацию ДВП и формирование амигдала-зависимой условно-рефлекторной реакции страха.

У животных нокаутных по гену статмина автор работы также наблюдал изменения в поведении, которые не отмечены в группе контрольных животных. У нокаутов снижается способность к выработке условно-рефлекторных реакций, животные демонстрируют более низкий уровень тревожности, они легче покидают зону комфорта и дольше исследуют пространство в установках «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». При этом установлено, что мутация не изменяет болевую чувствительность животных и не затрагивает параметры гиппокамп-зависимой памяти.

Таким образом установлено, что нокаутирование гена статмина ведет к значительному дефициту синаптической пластичности. На поведенческом уровне это проявляется в снижении базового уровня тревожности и способности животных к формированию условно-рефлекторных реакций страха. Электрофизиологически данный феномен сопровождается снижением уровня ДВП, как, впрочем, в таламо- и в кортико-амигдаларных синапсах проекционных клеток дорсолатерального ядра амигдалы.

В конце каждого раздела автор удачно и понятно приводит анализ и обсуждение полученных данных, которые хорошо обсуждаются в сравнении с данными существующими по этому поводу в литературе.

Диссертация содержит большое число авторских и взятых из других изданий качественных иллюстраций. Список литературы включает не очень большое число источников. Особо импонирует то, что автор не опускает спорные вопросы, приводит альтернативные точки зрения и обсуждает многие проблемы, которые в настоящее время еще не решены.

В разделе «Заключение» Е.А. Цветков приводит наиболее значительные результаты работы, которые позволили ему сформулировать итоговые выводы. Выводы (их 7) отличаются четкостью, приоритетностью и новизной. Выводы логично вытекают из результатов исследования, конкретны и касаются они преимущественно фундаментальных проблем физиологии. Вместе с тем у меня возникает желание убрать начисто из выводов всю аббревиатуру и привести истинные названия рецепторов, медиаторных систем, понятий и явлений типа ДВП и т.д.

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

Я считаю, что рассматриваемая диссертация как новая приоритетная и весьма перспективная нейрофизиологическая работа фундаментального плана следует быть незамедлительно опубликована в виде фундаментальной монографии в более развернутом виде. Лучше в нашем Издательстве СПбГУ.

Рецензируемая диссертационная работа является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, обладающей актуальностью, новизной и практической значимостью. Она обосновывает новое направление теории нейронных сетей, которое выявляет молекулярные механизмы формирования условно-рефлекторных страхов. Содержание диссертации соответствует поставленным задачам и подробно отражает последовательность их решения. Диссертация написана логичным, понятным языком, выводы обоснованы и хорошо аргументированы.

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.

Профессор кафедры
Общей физиологии С.-Петербургского
государственного университета
академик РАН

А.Д. Ноздрачёв

03.05.2018

