

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Ивановой Виолетты Олеговны «Сравнительные электрофизиологические характеристики синаптических ответов на апикальных и базальных дендритах пирамидных нейронов гиппокампа», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук в специализированный диссертационный совет 24.1.046.01 при Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бутлерова 5А., по специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных».

Актуальность избранной темы

Рецензируемая диссертация является новым и важным исследованием, посвященным актуальной проблеме нейрофизиологии – изучению свойств пирамидных нейронов гиппокампа, их синапсов и механизмов, определяющих их работу. Одна из основных характеристик синапсов – это рецепторный состав, который может изменяться при различных физиологических и патологических процессах, в частности, обеспечивая синаптическую пластичность. Кроме того, свойства синапсов модулируются посредством множества молекулярных механизмов, многие из которых до сих пор слабо изучены. В зависимости от условий функционирования нейронной сети, методических особенностей эксперимента те или иные механизмы могут преобладать и существенным образом модифицировать характеристики работы синапса. Возможно, что этим обусловлен факт, что данные, полученные в разных лабораториях, не всегда согласуются друг с другом. Поэтому исследование молекулярных механизмов, регулирующих работу синапсов, выявление закономерностей в распределении различных типов рецепторов на апикальных и дистальных дендритах пирамидных нейронов гиппокампа является важным шагом для более глубокого и всестороннего понимания функционирования нервной системы в норме и при патологиях. Полагаю, что актуальность диссертационной работы для современной физиологии несомненна.

Научная новизна

Автором работы с помощью методов фармакологических и электрофизиологических методов на переживающих срезах мозга крысы впервые показана разница во вкладе кальций-проницаемых (КП) АМПА-рецепторов в вызванные постсинаптические токи апикальных и базальных дендритов пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа. Кроме того, впервые показано наличие этих рецепторов на базальных дендритах пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа. Впервые описан эффект ингибирования синтазы оксида азота при индукции долговременной потенциации в областях str. radiatum и str. oriens поля СА1 гиппокампа. В опытах *in vivo* выявлено, что блокада NO-синтазы предотвращает амнестический эффект, вызванный блокадой синтеза белка с помощью циклогексимида в экспериментах с реконсолидацией памяти в модели условно-рефлекторного замирания на условный стимул у крыс.

В целом, полученные автором диссертации собственные данные являются убедительными, приоритетными, носят фундаментальный характер, расширяют современные представления о механизмах работы гиппокампа.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов, сформулированных в диссертации

Выносимые на защиту положения и выводы базируются на анализе совокупности полученных данных, лаконично сформулированы, конкретны. Они весомы, обоснованы собственными в ряде случаев уникальными материалами, полученными с помощью комплекса современных электрофизиологических (пэтч-кламп регистрации в переживающих срезах и регистрация полевых потенциалов) и фармакологических методов, а также поведенческих тестов на крысах. Корректное использование данных методик позволило автору собрать достаточный объем материала для дальнейшего проведения адекватного статистического анализа полученных данных. Все результаты диссертации опубликованы в престижных международных изданиях, в том числе European Journal of Neuroscience, International Journal of Molecular Sciences, Frontiers in Synaptic Neuroscience, то есть были прорецензированы ведущими экспертами мира.

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертационная работа Ивановой В.О. расширяет теоретические знания о молекулярных механизмах регуляции работы глутаматергических синапсов гиппокампа, а также о рецепторном составе синапсов, находящихся на апикальных и дистальных дендритах пирамидных нейронов области СА1 гиппокампа крысы. Кроме того, показана разница во влиянии оксида азота на долговременную потенциацию между апикальными и базальными дендритами. Таким образом, полученные данные вносят вклад в теоретическое понимание о распределении КП-АМПА-рецепторов в отростках пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа, а также в понимание роли оксида азота в формировании синаптических характеристик на этих отростках.

Практическая ценность и значимость работы связана с возможностью разработки новых подходов к лечению заболеваний, при которых наблюдается избыточная экспрессия КП-АМПА-рецепторов.

Общая характеристика работы

Диссертация изложена на 115 страницах, включает 25 рисунков. Работа состоит из введения, трех глав литературного обзора, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы включает 279 источников. *Следует отдельно отметить высокое качество оформления работы, что позволяют лучше понять результаты работы и демонстрируют профессиональное мастерство автора.*

Во введении имеется вполне обоснованная и хорошо аргументированная постановка задачи исследования, приведена общая характеристика работы.

Литературный обзор посвящен обсуждению структурной и функциональной организации гиппокампа. Эта часть информативна, однако *не хватает схемы с иллюстрацией нейронных связей в гиппокампе*. Далее дается подробное описание роли оксида азота в регуляции синаптической передачи, в том числе в синаптической пластичности. Также в работе достаточно подробно рассмотрены КП-АМПА-рецепторы, их роль в функционировании синапсов.

В целом, обзор дает полное представление об изучаемой проблеме и свидетельствует о хорошем умении автора анализировать и обобщать литературные источники.

Методы. В диссертации достаточно детально описаны методики, используемые в работе. Основная часть работы была выполнена на переживающих срезах гиппокампа, на которых производились как внутриклеточные отведения методом пэтч-клампа, так и полевые отведения. Автор использует в работе некоторые нетрадиционные подходы при приготовлении срезов, например, при порезке используется калий-глюконатный раствор, а не наиболее часто применяемый раствор Рингера или раствор на основе сахарозы или NDMG. Полагаю, что *в диссертации, в случае применения нестандартного варианта методики, аргументация в пользу выбранного варианта была бы уместна*.

Также в работе большой блок занимает поведенческие работы.

Считаю, что выбранный набор методов оптимален и позволяет решить поставленные задачи.

Результаты исследования в целом хорошо документированы и проиллюстрированы, грамотно обработаны и проанализированы статистически, изложены четко и логично, обсуждаются по ходу изложения материала.

В первой части результатов (раздел 4.1) автор подробно исследует субклеточную локализацию КП-АМПА рецепторов на дендритах пирамидных нейронов CA1. Для этого диссертант использует ряд показателей, которые обычно применяют для этих целей: индекс выпрямления и фармакологическую блокаду. Виолетта Олеговна выявляет достаточно высокий уровень экспрессии КП-АМПА рецепторов у пирамидных нейронов как на апикальных, так и на базальных синапсах гиппокампа у молодых мышей. Хочу отметить, что этот результат несколько необычен, так как детектируемый уровень экспрессии КП-АМПА рецепторов на пирамидных нейронах обычно наблюдается либо после высокой синаптической активности (например, после протокола индукции долговременной синаптической пластичности) или при патологических состояниях. *В качестве вопроса для дискуссии: чем автор объясняет отличие своих результатов по экспрессии КП-АМПА рецепторов у пирамидных нейронов от данных, полученных в других лабораториях? Так как встраивание КП-АМПА-рецепторов может происходить довольно быстро, то может ли это быть связано с какими-то методическими особенностями проведения эксперимента?*

Другие вопросы и замечания:

Автор показывает разницу в Индексе выпрямления для базальных и апикальных дендритов. Так как пирамидные нейроны – это крупные клетки со сложной геометрией, то может ли эта разница быть связана с проблемой пространственного клампа? С помощью каких экспериментов можно это проверить?

На странице 54 автор пишет, что «В результате вымывания эндогенных полиаминов из апикальных и базальных дендритов амплитуда ответов росла вплоть до 20-й минуты записи». От чего зависит время «разблокирование» КП-АМПА-рецепторов от эндогенных полиаминов при синаптической активности? Зависит ли это время от мембранного потенциала?

В разделе результатов 4.2 показано, что блокада синтазы оксида азота изменяет вклад КП-АМПА рецепторов в токи апикальных, но не базальных дендритов.

В разделе 4.3. описана роль блокады синтазы оксида азота на долговременную потенциацию. Автор сравнивает эффект для синапсов на базальных и апикальных дендритах, показывает, что блокада синтеза оксида азота нарушает позднюю фазу долговременной потенциации в *str. radiatum*, тогда как в *str. oriens* нарушается только ранняя фаза. В качестве методического замечания отмечу, что регистрирующий электрод для записи с радиального слоя желательно ставить чуть дальше от пирамидного слоя, поскольку на приведенных в диссертации регистрациях они больше похожи на отведения с пирамидного слоя.

В разделе 4.4 показано, что ингибирование синтеза оксида азота предотвращает нарушение памяти, вызванное блокадой синтеза белка во время реактивации условно-рефлекторного страха.

В обсуждении и заклучении кратко анализируются основные этапы и результаты исследовательской работы. Выводы диссертационного исследования логически вытекают из изложенных результатов, соответствуют поставленным в работе цели и задачам.

Несмотря на то, что работа в целом выполнена на высоком методическом уровне, есть замечания по статистическому анализу данных. Например, в некоторых случаях остается неочевидным выбор метода анализа (стр. 52, абзац 3 и рисунок 4, используется однофакторный дисперсионный анализ, хотя, следуя логике автора и рис. 4б, следует применить парный тест Стьюдента). На диаграммах, иллюстрирующие основные статистические данные, кроме средних значений с ошибкой желательно приводить индивидуальные значения, что позволит читателю оценить и распределение данных. Однако полагаю, что более точный статистический анализ не повлияет на основные выводы диссертации.

Заключение по диссертационной работе

По объему выполненной работы, актуальности, научной новизне основных положений, целостности, законченности, практической значимости и публикациям диссертационная работа Ивановой Виолетты Олеговны «Сравнительные электрофизиологические характеристики синаптических ответов на апикальных и базальных дендритах пирамидных нейронов гиппокампа», полностью соответствует требованиям п.9. «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Иванова Виолетта Олеговна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных».

Официальный оппонент по диссертации:

Заведующий лабораторией

Молекулярных механизмов нейронных взаимодействий

Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Института эволюционной

физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова

Российской академии наук,

доктор биологических наук

Зайцев Алексей Васильевич

«24» ноября 2021 г.



Подпись руки
Зайцева А.В.
1р (Иванова В.О.)
24.11.2021

Адрес: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук. тел.: 8(812) 552-30-12; e-mail: aleksey_zaitsev@mail.ru