



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

ул. Вавилова д. 26, Москва, 119334
Тел.: (499) 135-33-22. Факс (499)135-80-12. E-mail: info@idbras.ru
ОКПО: 02699062 ОГРН 1027700450800 ИНН/КПП 7736044850/773601001
<http://idbras.ru>

27.04.2020 № 12.506/01-92
На № 45 от 20.03.2020

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН
член-корреспондент РАН, д.б.н.



А.В. Васильев

27 апреля 2020 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Кедрова Александра Владимировича
«Вовлечение нейронов разного возраста в приобретение и извлечение обонятельной
памяти в мозге взрослых мышей», представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность исследования. Диссертационная работа Кедрова Александра Владимировича посвящена изучению участия популяций предсуществующих и новообразованных из стволовых клеток нейронов зубчатой извилины гиппокампа и обонятельной луковицы в процессах приобретения и извлечения обонятельной ассоциативной памяти у мышей в различные сроки после однократного обучения условно-рефлекторному замиранию (УРЗ). Исследование, проведенное на модели обонятельной памяти, уточняет степень вовлеченности новых нейронов в этот процесс, и открывает неизвестные стороны биологии нейральных стволовых клеток. Задачи и результаты проведенного исследования важны для решения остро дискуссионных на сегодняшний день вопросов о механизмах формирования памяти и роли в них нейральных стволовых клеток. Обе проблемы тесно связаны и активно исследуются, как с позиции фундаментальной биологии, так и с позиции регенеративной медицины.

Научная новизна исследования. В диссертации предложены и применены новые методы для изучения клеточных механизмов обонятельной памяти и участия в них нейральных

столовых клеток. Впервые разработана и валидирована модель однократного обонятельного условно-рефлекторного замирания на мышах, которая дает возможность фиксировать как процесс приобретения, так и извлечения памяти. Обучение животных показало, что гранулярные клетки зубчатой извилины (ГКЗИ) и гранулярные клетки обонятельной луковицы (ГКОЛ) активируются при извлечении памяти по сравнению с обучением. Впервые проведенный количественный анализ c-Fos активированных нейронов установил, что при извлечении обонятельной памяти активируется только супрапирамидальный отдел зубчатой извилины, но не инфрапирамидального отдела. В работе впервые показано, что в однократной модели обонятельного условно-рефлекторного замирания при извлечении памяти активируется значительно меньшая доля новообразованных ГКОЛ, чем в описанных ранее оперантных обонятельных моделях с положительным подкреплением. На сегодняшний день эти данные дают наиболее полное представление об участии гранулярных нейронов разных отделов зубчатой извилины гиппокампа и ГКОЛ в приобретении и извлечении памяти, вовлеченности в эти процессы нейральных стволовых клеток и их потомков, и значительно расширяют наше представление о функциональной роли новообразованных клеток в обеспечении обонятельного поведения. Результаты работы позволили оценить в какой степени вовлечение новообразованных нейронов в обонятельное обучение зависит от типа поведенческой задачи.

Достоверность и обоснованность полученных результатов. Для решения поставленных задач был использован комплексный подход, включающий: разработку и валидацию обонятельной модели однократного условнорефлекторного обучения у мышей; широкий набор современных морфологических методов, оригинальные методы количественного анализа; методы визуализации и обширный аппарат для статистической обработки результатов. Используемые методы подробно изложены в соответствующем разделе диссертации и их адекватность для исследования не вызывает сомнений, а полученные результаты имеют надежное статистическое обоснование. Результаты проведенного исследования неоднократно обсуждались на международных и российских конференциях (7 тезисов) и опубликованы в 3 статьях в рецензируемых журналах, входящих в базу данных «Web of Science».

Практическая и теоретическая значимость работы. Результаты работы имеют несомненную теоретическую значимость, поскольку они уточнили степень вовлеченности новообразованных из нейральных стволовых клеток нейронов субвентрикулярной зоны и зубчатой извилины гиппокампа в ольфакторную память, и позволили оценить в какой

степени этот процесс зависит от типа поведенческой задачи. Разработанная и валидированная автором обонятельная модель однократного условнорефлекторного обучения у мышей и морфологические экспериментальные данные могут быть использованы в исследованиях, проводимых как в нашей стране, так и за рубежом. Методические разработки поведенческих экспериментов могут быть востребованы научными коллективами, связанными с проблемой физиологии памяти: кафедра Высшей нервной деятельности МГУ им. М.В. Ломоносова; ФГБУН Институт Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Методы и результаты морфологических исследований могут представлять интерес для: кафедры Клеточной биологии МГУ им. М.В. Ломоносова; ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН; ФГБУН Институт биологии гена. Результаты настоящего исследования должны быть учтены в курсах лекций по стволовым клеткам.

Объем и структура работы. Диссертация написана по традиционному плану, она состоит из введения, обзора литературы, описания методики экспериментов, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 105 страницах и содержит 13 рисунков. Список цитированной литературы содержит 213 источников, из них 5 на русском и 208 на английском языках. Текст автореферата полностью отражает содержание диссертации.

Общая характеристика работы. Во «Введении» обоснована актуальность выбранной темы исследования, четко сформулированы цель и задачи работы, отмечена научная новизна, теоретическая и практическая значимость, указан личный вклад автора, предоставлены сведения о публикациях по теме диссертации и докладах на конференциях.

В главе «Обзор литературы» первый, самый объемный раздел, посвящен проблемам нейрогенеза в мозге взрослых млекопитающих. После краткого исторического очерка, автор детально рассматривает особенности биологии нейральных стволовых клеток (НСК) и процессы нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа и субвентрикулярной зоне боковых желудочков мозга. Далее приводятся данные литературы о роли НСК и вновь образованных нейронов в поведении животных. Детально разобран постадийный генез новых клеток и факторы, влияющие на переживание и число клеток. Рассмотрены стадии генеза новых гранулярных клеток в гиппокампе и их роль в процессах памяти и обучения. В заключительном разделе обзора представлены данные о гене *c-Fos* и его участии в первичной реакции нейрона на стимуляцию, что дало возможность выбрать *c-Fos* в качестве маркера активации разновозрастных популяций нейронов в ситуациях обучения и извлечения памяти.

В главе «Методика» содержится детальное описание нового, разработанного автором, метода обонятельной модели однократного условнорефлекторного обучения у мышей, его валидация, группы экспериментальных животных, методы обучения и тестирования. Описана использованная в работе линия трансгенных мышей; отдельно даны морфологические методы с описанием фиксации животных, подготовкой срезов мозга, детализированы иммуноцитохимические методы и использованные антитела. Представлены методы визуализации микроскопических изображений, и разработанный автором оригинальный метод количественного анализа нейронов в 3D. Морфологический анализ проводили «слепым» методом по закодированным препаратам. Особое внимание уделено методам статистического анализа результатов. Используемые методы соответствуют поставленным задачам. Объем использованного материала значителен и достаточен для получения достоверных результатов.

В главе «Результаты» представлены результаты обучения и тестирования животных в модели однократного обучения обонятельному условнорефлекторному замиранию, которые свидетельствуют, что сформированная обонятельная ассоциативная память сохраняется не менее 14 дней после обучения. Во время тестирования памяти результаты количественного анализа c-Fos нейронов в гиппокампе и гранулярном слое обонятельной луковицы показали, что в тесте на 14-й день число клеток было достоверно большим по сравнению с таковым непосредственно после процедуры обучения. Интересно, что в гиппокампе активируются преимущественно нейроны супрапирамидального отдела зубчатой извилины, однако среди них не выявлено вновь образованных из НСК нервных клеток. У мышей из группы «Обученных» в гранулярном слое обонятельной луковицы после извлечения памяти как на 3-й, так и на 14-й день после обучения число c-Fos-положительных гранулярных нейронов было выше, чем непосредственно после обучения. Однако лишь небольшая доля новообразованных из НСК гранулярных клеток активируется при обучении и/или извлечении обонятельной памяти в данной модели. Результаты оценки пролиферации стволовых клеток и амплифицирующихся предшественников зубчатой извилины гиппокампа в группе обученных животных показали повышение пролиферации НСК непосредственно после обучения и падение через 3 суток.

В главе «Обсуждение» приводится детальный критический анализ собственных результатов автора с привлечением данных мировой литературы по изученным вопросам. Отмечено, что разработанная модель обонятельного поведения может иметь ряд преимуществ в сравнении с другими моделями, в скорости обучения, длительности

сохранения памяти, и возможности исследования паттернов активации нейронов не только во время извлечения памяти, но и в ранние моменты ее формирования. В данной модели как ГКЗИ, так и ГКОЛ преимущественно активируют экспрессию c-Fos при извлечении памяти. В отличие от ряда других исследований в данной модели не обнаружили в гиппокампе новообразованных гранулярных клеток, ни при приобретении памяти, ни при её извлечении. В обонятельной луковице в процессе извлечения памяти активируется малый процент новообразованных гранулярных клеток, что согласуется с результатами других работ, предполагающих вовлечение новых нейронов преимущественно в оперантных задачах обучения.

В главе «Заключение» в сжатой форме приводятся итоги работы, обсуждение значения и применимости результатов проведенного исследования.

В разделе «Выводы» даны краткие, логичные выводы, которые полностью соответствуют полученным результатам.

Замечания по диссертации. В тексте имеется некоторое число опечаток на стр. 6, 10, 11, 18, 26, 32, 69, не корректные фразы «...наличии взрослого нейрогенеза у человека..»

На рисунке 2 автор демонстрирует несколько устаревшую схему ниши стволовых клеток в V-SVZ. В настоящее время, в этой области выделяют два типа НСК, различающихся по морфологии и молекулярным свойствам. Клетки имеют разные сигнальные системы, так как одни связаны ресничкой с желудочком, а другие нет.

Для обсуждения роли нейральных стволовых клеток в механизмах памяти, автор привлек исследования Encinas et al., 2011о нейрогенезе в гиппокампе, предложивших концепцию «одноразовых» стволовых клеток, имея в виду определенную иерархическую последовательность в генезе новых нейронов и судьбе НСК. Однако наряду с этим существует еще несколько не менее значимых гипотез, где предлагаются иные формы поведения НСК и их потомков в гиппокампе. Эти исследования следовало обсудить в «Обзоре литературы», где принято представлять не одну, а разные точки зрения на проблему. Кроме того, среди большого числа цитированной литературы, явный недостаток исследований последних лет, которые были бы важны ввиду актуальность данного направления.

Следует отметить, что все высказанные замечания не снижают ценности диссертационной работы А.В. Кедрова и могут быть учтены в будущем.

Заключение Диссертация Кедрова Александра Владимировича на тему «Вовлечение нейронов разного возраста в приобретение и извлечение обонятельной памяти в мозге взрослых мышей», выполненная под руководством академика РАН, доктора медицинских наук, профессора К.В. Анохина, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной задачи, направленной на раскрытие клеточных механизмов ассоциативной обонятельной памяти.

По методическому уровню, новизне и научно-практической значимости полученных результатов диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями от 01.10.2018г. № 1168, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Кедров Александр Владимирович заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Отзыв подготовила Александрова Мария Анатольевна, доктор биологических наук. Отзыв обсужден и утвержден на институтском семинаре профильных лабораторий (нервных и нейроэндокринных регуляций; нейробиологии развития; физиологии рецепторов и сигнальных систем; сравнительной физиологии развития; группы эмбриофизиологии лаборатории проблем регенерации) «27» апреля 2020 г. протокол № 2.

Александрова Мария Анатольевна

ул. Вавилова, 26, Москва, 119334

8-917-520-75-96

mariaaleks@inbox.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН (ИБР РАН)

Главный научный сотрудник



Подпись Александровой М.А. удостоверяю.

Ученый секретарь ИБР РАН

кандидат биологических наук, доцент Хабарова Марина Юрьевна



/ Хабарова М.Ю./