Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу

Гладкова Арсения Андреевича на тему:

«Динамика вызванной активности нейронной сети культуры диссоциированных клеток гиппокампа мышей при электрической стимуляции»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность темы диссертации

Обработка информации в центральной нервной системе и работа мозга в целом является результатом взаимодействия нейронов между собой, которое обеспечивается процессами синаптической передачи. Выявление закономерностей образования нейронных связей и механизмов, обеспечивающих их пластические перестройки, является фундаментальной задачей современной физиологии. В последние десятилетия достигнут значительный прогресс в понимании клеточных и молекулярных механизмов синаптической пластичности на уровне функционирования отдельной синаптической связи или небольших групп нейронов и гораздо меньше имеется информации о динамике изменения активности в больших популяциях нейронов во время развития организма и при пластических перестройках синаптической передачи, обеспечивающих обучение и память. Диссертационная работа **Арсения Андреевича Гладкова**, посвященная анализу **динамики вызванной активности нейронной сети культуры диссоциированных клеток гиппокампа мышей при электрической стимуляции,** относится к этой актуальной проблеме современной физиологии мозга. В работе исследованы процессы генерации и распространения паттернов популяционной электрической активности, их изменения в зависимости от уровня активности и другие явления, лежащие в основе функционирования мозга на сетевом уровне. Для решения поставленной задачи автором был использован анализ нейронных связей с помощью одновременной регистрации активности в сети функционально связанных нейронов. Техническая возможность решения этой задачи обеспечивалась использованием диссоциированных клеточных культур, выращиваемых на микроэлектродных матрицах. Эта методика, активно развивающаяся в последнее десятилетие, дает возможность длительно и неинвазивно одновременно регистрировать активность большого числа нейронов для изучения динамики формирования синаптических связей. Основные сложности применения данной модели связаны с неупорядоченной архитектурой связей между нейронами. В такой сети

трудно установить пути распространения сигналов, выбрать участки для применения стимуляции и оценить изменения сетевой активности после стимуляции. Для решения этой задачи автором были разработаны критерии, позволяющие оценить особенности динамики сетевой активности и влияние различных протоколов электрической стимуляции на формирование межнейронных связей. Особый интерес представляет оценка влияния стимуляции, изменяющейся в зависимости от вызванной активности в нейронной сети (стимуляции с обратной связью), поскольку она предполагает достижение адаптивного результата в простейшей модели культуры диссоциированных клеток.

Проблема неупорядоченности архитектуры связей в культурах клеток мозга может быть решена в результате развития методов, позволяющих манипулировать навигацией растущих аксонов. Одна из задач диссертационной работы Гладкова А.А. состояла в разработке новой экспериментальной модели культуры нервных клеток с направленной связью между двумя нейронными популяциями. Все вышесказанное говорит о несомненной актуальности проведенного исследования.

Научная новизна исследования

В работе А.А. Гладкова проведено детальное исследование закономерностей формирования сетевой активности и пластических свойств синаптической передачи в диссоциированных культурах нейронов гиппокампа. Проведенное исследование позволило впервые показать, что низкочастотная и высокочастотная стимуляция вызывают изменение паттернов распространения активности в нейронной сети. Обнаружено, что как высокочастотная, так и низкочастотная стимуляция приводит к изменению архитектуры межнейронных связей, не влияя существенным образом на число кросскорреляционных связей между активностью различных участков нейронной сети. Для оценки изменений архитектуры кросскорреляционных связей был разработан критерий «Коэффициент изменения архитектуры связей», отражающий появление новых и исчезновение старых связей.

Впервые установлено, что эффективность протокола симуляции с обратной связью в культивируемой нейронной сети зависит от исходного уровня активности на выбранном участке, и этот эффект связан не с локальными изменениями, как предполагалось ранее, а затрагивает сеть в целом.

Автором разработан уникальный способ индукции пластичности в сети культивируемых диссоциированных клеток мозга с направленной связью с помощью высокочастотной электрической стимуляции. Особенность разработанной модели заключается в том, что благодаря формированию направленной связи относительно точно

устанавливаются участки локализации пре- и постсинаптических нейронов, которые затем стимулируются с задержкой в соответствии с известными закономерностями STDP (spike-timing-dependent plasticity).

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

Диссертация изложена на 146 страницах, содержит 32 иллюстрации. Список литературы включает 206 источников. Работа построена по традиционному плану. Во введении автор обосновывает актуальность работы, формулирует ее цель, которая четко раскрывается в задачах. Обзор литературы написан хорошим языком, не перегружен лишней информацией. В обзоре изложена предложенная автором классификация известных экспериментальных протоколов электрической стимуляции, индуцирующих изменения активности в культурах диссоциированных клеток мозга. Приведено сопоставление результатов применения аналогичных протоколов в различных научных группах, что позволило выявить общие закономерности в наблюдавшихся эффектах, а также особенности и разночтения в получаемых результатах. Сводная таблица этого анализа дана в приложении. Во второй части обзора рассмотрены различные современные методы, позволяющие управлять топологией культуры нервных клеток, дана критическая оценка их возможностей для создания однонаправленной связи между нейронными сетями.

В разделе "Методы исследования" автор описывает применявшиеся экспериментальные протоколы и методы анализа нейрональной активности. Эксперименты проводились на диссоциированных клетках гиппокампа мышей (E18) после трех недель развития в условиях *in vitro*. Клетки культивировались на матрицах с плоскими микроэлектродами, регистрирующими внеклеточные потенциалы и позволяющими стимулировать различные участки нейронной сети. Для оценки влияния электрической стимуляции использовали стандартные частотные и временные показатели сетевой активности, а также новые впервые разработанные индикаторы для оценки функциональных изменений в нейронной сети со случайной архитектурой связи. Для оценки функциональных связей в нейронной сети использовали общепринятый метод корреляционного анализа сетевой активности, регистрируемой в различных участках сети.

Поставленная в работе задача разработки модели для изучения пластичности в нейронной сети с направленной связью была решена с помощью методов микрофлюидики, которые лишь в последнее время стали применяться для задач управления топологией нейронной сети. Таким образом, дизайн экспериментов

полностью соответствует поставленной цели, и сформулированные задачи решались с использованием комплекса современных методов нейрофизиологии.

Результаты и их обсуждение представлены в третьей главе диссертации. Результаты в целом хорошо документированы, грамотно обработаны и проанализированы, поэтому не вызывает сомнений **достоверность** полученных данных. Выносимые на защиту положения и выводы основаны на анализе совокупности полученных данных. В разделе "Заключение" автор подводит итог работы, проводя сравнительный анализ результатов, полученных при исследовании синаптической пластичности с использованием разных способов стимуляции в нейронных сетях со случайной архитектурой связей и в сети с определенным расположением пресинаптических и постсинаптических нейронов. В этом разделе работы проанализирована также адекватность использованных в работе индикаторов функционального состояния сети для оценки изменений, вызванных электрической стимуляцией. Заключают текст диссертации "Выводы" и Список сокращений и литературы. Выводы, сделанные на основании полученных автором данных, обоснованы и соответствуют поставленным задачам.

Наиболее интересной частью диссертационной работы А.А.Гладкова представляется исследование, посвященное анализу синаптической пластичности в культуре нервных клеток с направленной связью между двумя нейронными сетями. С целью создания направленных синаптических связей была разработана уникальная модель, включающая микрофлюидный чип, в котором две камеры соединены микроканалами, форма которых обеспечивала преимущественный рост аксонов из камеры-источника в камеру-приемник. Разработанный методический подход позволил исследовать пластические перестройки связей, в которых сигнал распространяется в одном направлении, поскольку пре- и постсинаптические клетки находятся в разных камерах. Полученные данные показали эффективность использования предложенной экспериментальной модели для вызова функциональных изменений в культивируемой нейронной сети. Кроме того, следует подчеркнуть, что этот метод представляется перспективным для изучения механизмов направленного роста аксонов, роли трофических факторов, обеспечивающих образование синаптических связей, и общих принципов формирования нейронных сетей и обработки информации в головном мозге, а также для исследования эффектов различных фармакологических препаратов, например, при моделировании заболеваний нервной системы.

По результатам исследований А.А.Гладковым опубликовано 8 статей в рецензируемых изданиях, включенных в перечень ВАК, 2 статьи в сборниках и 25 тезисов

конференций. Автореферат диссертации позволяет получить достаточные представления о содержании диссертации и полностью соответствует идеям и выводам диссертации. Вынесенные на защиту научные положения обоснованы и соответствуют поставленным целям и задачам.

Значимость для науки и практики

Результаты исследований, представленные в диссертационной работе Гладкова А.А, носят фундаментальный характер, дополняя современные знания о принципах системной организации нейронных сетей и механизмах синаптической пластичности. Полученные в работе данные расширяют теоретические представления о функционировании нейронных сетей при воздействии электрической стимуляции, которые в дальнейшем могут быть использованы при исследованиях механизмов пластичности в нейронной сети. Разработанные показатели изменения кросскорреляционных связей активности в различных участках сети могут использоваться для оценки влияния различных химических факторов и физических воздействий на функционирование нейронной сети.

Экспериментальная модель пластичности в сети культивируемых диссоциированных клеток мозга с направленной связью позволит изучать сетевые эффекты при изменении связей между отдельными нейронами. Кроме того, данная модель применима для тестирования локального воздействия фармакологических препаратов, исследования взаимодействий нейронов различных типов, нейронов различных отделов мозга, а также нейронов с другими типами тканей. Данная экспериментальная модель открывает перспективы для дальнейшей разработки технологии «мозг на чипе».

Ключевые положения работы могут быть включены в курсы лекций по физиологии в образовательных учреждениях. Результаты работы будут востребованы в исследованиях синаптической пластичности и механизмов изменений синаптической передачи при дисфункциях нервной системы.

Замечания и вопросы к содержанию диссертационной работы

Принципиальных критических замечаний к диссертационному исследованию А.А.Гладкова у меня нет. Есть некоторые замечания, касающиеся оформления работы.

1. В тексте диссертации и в автореферате встречаются опечатки и неточности, как, например, на с. 46 - "Амплитуда найденных импульсов находились в диапазоне 10-100 мВ". Судя по приведенному рисунку, амплитуда импульсов составляла 10-100 мкВ. На с. 59 использовано неудачное выражение "экспериментально рассчитано" и др.

2. В работе недостаточно полно охарактеризована пространственно-временная структура культуры нейронов гиппокампа. Приведена всего одна микрофотография

клеточной культуры на матрице, по-видимому, на раннем сроке культивирования (рис. 4, DIV не указаны). Нет данных о плотности культуры, соотношении нервных и глиальных клеток, изменениях пространственной структуры нервной ткани - формировании кластеров и т.п.

3. Встречаются неточные ссылки, как например, на работу Chiappalone et al., 2007, выполненную на нейронах коры, а не гиппокампа, как указано в тексте работы.

4. При упоминании в тексте работы российских авторов на русском языке следует указывать кроме фамилии инициалы (стр. 39).

Кроме того, хотелось бы получить ответы на несколько вопросов, возникающих при чтении работы:

1. Основным типом нейронной активности, анализируемой в работе, является пачечная активность нейронов и нейронных популяций. И хотя дается общепринятое определение такой активности, не совсем ясно, какова природа этой пачечной активности, какова роль свойств возбудимой мембраны и синаптических связей в ее формировании и каким видам активности мозга *in vivo* соответствует сетевая пачечная активность на матрицах.

2. Не вызывает сомнений, что ритмическая активность мозга играет большую роль в организации определенных форм поведения, но это лишь одна из форм спонтанной активности нейронов. Каково соотношение сетевой пачечной активности и одиночных разрядов нейронов в сети, формирующейся в условиях культивирования?

3. Электрическая активность, регистрируемая одним электродом на матрице, может отражать спайковую активность нескольких нейронов. Разная амплитуда спайков внутри пачки затрудняет разделение активности разных нейронов на основании различий их амплитуды. Имеются ли дополнительные критерии и техническая возможность разделения активности разных нейронов и имеет ли это принципиальное значение при анализе сетевой активности?

Высказанные замечания не носят принципиального характера и не меняют общей положительной оценки работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, тема диссертационного исследования **Гладкова Арсения Андреевича «Динамика вызванной активности нейронной сети культуры диссоциированных клеток гиппокампа мышей при электрической стимуляции»** полностью соответствует заявленной специальности 03.03.01 – физиология. Сама

диссертационная работа Гладкова А.А., представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, которая содержит новое решение актуальной задачи в области физиологии, а также расширяет и дополняет современные знания о механизмах памяти и нейропластичности. По актуальности, поставленным целям и задачам, объему проведенных исследований, новизне полученных результатов, их научной и практической значимости, методическому уровню исследований, достоверности полученных результатов, обоснованности выводов и положений, выносимых на защиту, выполненная диссертационная работа полностью соответствует требованиям, изложенным в разделе II «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.03.01 - "Физиология".

Ведущий научный сотрудник
лаборатории функциональной синаптологии
Отдела исследований мозга
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научный центр неврологии» (г. Москва)
доктор биологических наук,

Шаронова **Шаронова Ирина Николаевна**

«26» ноября 2018 г.

Контактные данные:

В.н.с., д.б.н. И.Н. Шаронова,
105064 Москва, переулок Обуха, 5, Отдел исследований мозга ФГБНУ НЦН,
Тел. раб. (495) 917 96 64; e-mail: sharonova.irina@gmail.com

Даю согласие на сбор, обработку и хранение персональных данных Шаронова И.Н. Шаронова

Подпись, ученую степень Шароновой Ирины Николаевны заверяю.

Ученый секретарь ФГБНУ НЦН, к.м.н. А.Н. Евдокименко