

УТВЕРЖДАЮ

Директор федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт
нормальной физиологии имени П.К. Анохина»
чл.-корр. РАН, проф., д. м. н.



Судаков С. К.

декабря 2018 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина» на диссертационную работу Гладкова Арсения Андреевича «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» (биологические науки).

Актуальность темы диссертационного исследования. Диссертация А.А. Гладкова посвящена одной из наиболее актуальных проблем современной нейрофизиологии - вопросу о пластичности связей в нейронных сетях мозга. Интерес к данной проблеме обусловлен стремлением получить новые фундаментальные знания о клеточных механизмах обучения и памяти – ключевых базовых свойствах нервной системы. Экспериментальное исследование этих процессов на клеточном уровне в целом мозге, особенно когда речь идет об изучении зависимости импульсной активности нервных клеток от входных сигналов, затруднено сложностью организации нервной системы млекопитающих, ее высокой функциональной дифференциацией, а также дополнительным влиянием непрерывных сигналов, в том числе нейрогуморальных, от внутренней и внешней среды. В связи с этим, закономерно обращение современной нейрофизиологии к изучению этих вопросов на более простых модельных системах (таких как срезы мозга, культуры диссоциированных нейронов) с применением современных

электрофизиологических и оптических методов регистрации и стимуляции активности клеток. Поэтому в качестве объекта исследования в диссертационной работе А.А. Гладкова была вполне обоснованно выбрана модель диссоциированных клеток гиппокампа мыши длительно культивируемых на матрице плоских микроэлектродов. Эта модель имеет ряд важных преимуществ для исследования базовых закономерностей динамики и пластичности импульсной активности нервных клеток в нейронной сети. Во-первых, матрица микроэлектродов позволяет как стимулировать, так и регистрировать электрическую активность нейронов. Во-вторых, это можно осуществлять одновременно в различных участках сети и с высоким временным разрешением. В-третьих, такая регистрация и стимуляция может осуществляться в данном препарате хронически, на протяжении многих дней, даже недель. Наконец, в отличие от целого мозга, эти операции могут осуществляться под непосредственным оптическим контролем изучаемой нейронной сети.

Хотя изучению пластичности на уровне нейронной сети в такой экспериментальной модели посвящено достаточно большое количество работ, многие актуальные вопросы остаются нерешёнными. Одним из самых острых и спорных вопросов в этой области является возможность достижения такой простой нейронной сетью диссоциированных клеток адаптивного результата при применении стимуляции с обратной связью, то есть моделирование в ней процесса адаптивного обучения. Это фундаментальный вопрос требует экспериментальной проверки, также, как и связанные с ним задачи исследования различных режимов используемых для этого электрической стимуляции сети, в частности сравнения влияние низкочастотной и высокочастотной стимуляции на функциональную сетевую активность, а также решения задачи направленного воздействия на определённую связь в сети диссоциированных клеток. Весь этот комплекс вопросов и задач явился предметом диссертационного исследования А.А. Гладкова, что определяет безусловную актуальность этой работы.

Связь с планами соответствующих отраслей наук. Проведённые исследования были выполнены при поддержке РФФИ (14-19-01381) и грантов президента РФ (МК-4602.2013.4, МК-8731.2016.4).

Новизна исследования и полученных результатов. Автором работы была выполнена серия оригинальных исследований с использованием комплекса современных методов клеточной и сетевой нейрофизиологии. В ходе отработки экспериментальной *in vitro* модели для исследования сетевой

пластичности в первичной культуре нервных клеток А.А. Гладковым были разработаны новые критерии сетевой активности, которые могут иметь применение в дальнейших исследованиях в данной области: коэффициент изменения архитектуры связей, коэффициент новых связей, коэффициент исчезновения связей. Подтверждена эффективность применения данных критериев для детектирования вызванной стимуляцией пластичности в нейронной сети.

В экспериментальной части диссертационной работы А.А. Гладковым была подтверждена возможность достижения заданного уровня активности в нейронных сетях первичных культур гиппокампа со случайной архитектурой морфофункциональных связей при применении протокола стимуляции с обратной связью. Научная новизна этого раздела работы заключается в выявлении обстоятельства, что в случаях успешного достижения заданного уровня активности на выбранном участке сети, динамика активности меняется и на других участках сети. Это безусловно важная новая закономерность организации сетевой активности системы культивируемых клеток в модели с достижением результата. Кроме того, в работе было впервые выяснено, что эффективность достижения заданного уровня активности зависела от исходного уровня активности в сети.

Помимо этого, в работе был установлен ряд новых закономерностей в изменении динамики активности нейронной сети при воздействии низкочастотной и высокочастотной стимуляции, а также при стимуляции с обратной связью. Так, было установлено, что и низко- и высокочастотная стимуляции приводят к изменениям архитектуры функциональных связей в нейронной сети. Также было впервые выявлено, что низкочастотная стимуляция вызывает изменение паттерна активации спонтанных сетевых пачек.

Результаты исследований выявили, что эффективность стимуляции с обратной связью была достаточно низкой ($\leq 50\%$). Такая низкая эффективность получения заданной активности, а также эффекты, выявленные при изучении низкочастотной и высокочастотной стимуляции, привели автора к заключению о нецелесообразности использования текущих вариантов методик электрической стимуляции с обратной связью для изучения пластичности в модели культуры диссоциированных клеток. Это негативное заключение на основе проделанных в работе экспериментов имеет безусловно важное значение, поскольку оно привлекает внимание к принципиальным проблемам использования нейронной сети со случайной архитектурой связей для изучения клеточной и сетевой пластичности и заставляет искать новые пути решения этой проблемы, новые

экспериментальные модели. В диссертационной работе А.А. Гладкова разработана такая новая экспериментальная модель индукции пластичности в нейронной сети культуры диссоциированных клеток гиппокампа с направленной архитектурой морфофункциональных связей с помощью электрической стимуляции на основе правила STDP. Данная новая разработка существенно продвигает исследования принципов работы нейронных сетей.

В целом, полученные автором диссертации собственные данные являются оригинальными, убедительными и расширяют современные представления о динамике биоэлектрической активности нейронной сети диссоциированных клеток при различных режимах электрической стимуляции.

Оценка достоверности результатов, положений и выводов диссертационного исследования. Достоверность результатов, положений и выводов диссертации определяется последовательной логической структурой исследования, основывается на большом объеме экспериментальных данных, собранных диссертантом. Результаты работы сформулированы на базе достаточно большой выборки экспериментальных данных с применением адекватного статистического анализа. Основные экспериментальные результаты опубликованы в представительных рецензируемых журналах и доложены на более чем 20 международных научных конференциях различного профиля, что также свидетельствует об их значимости, надёжности и достоверности.

Значимость результатов для науки и практики, рекомендации по использованию результатов и выводов, приведенных в диссертации. Диссертационная работа А.А. Гладкова расширяет теоретические знания о функционировании нейронных сетей в условиях их культивирования *in vitro* и при различных режимах их электрической стимуляции. Результаты диссертационной работы могут быть полезны для более глубокого понимания процессов динамики сетевой активности и её взаимосвязи с пластичностью синаптических связей между отдельными нейронами. Выявленные чувствительные индикаторы изменений активности нейронов в сети, отражающие изменения архитектуры связей между временными последовательностями импульсов различных участков нейронной сети, могут быть использованы для доклинического тестирования лекарственных препаратов, а также для различных фундаментальных исследований в модели первичных культур клеток мозга.

С практической точки зрения интересна разработанная автором экспериментальная модель индукции пластичности в сети культивируемых диссоциированных клеток гиппокампа с направленной связью. Само по себе формирование заданной направленной связи между популяциями клеток мозга *in vitro* открывает широкие возможности для исследования взаимодействия между различными типами клеток мозга и других тканей, что имеет существенное значение для современной нейробиологии. Разработанная модель для направленного воздействия электрическими стимулами на отдельную связь в нейронной сети может быть, в частности, полезна для разработки искусственных интеллектуальных систем, интерфейсов мозг-компьютер, а также развития методов электроцевтики.

Помимо этого, результаты работы могут быть использованы в образовательном процессе, для преподавания в составе специальных курсов лекций и лабораторных практикумов студентам и аспирантам биологических, биофизических и медицинских направлений подготовки.

Оценка содержания выполненной работы. Диссертация изложена на 146 страницах печатного текста и содержит 32 иллюстрации. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы и приложения. Список литературы включает 206 источников, из них 194 иностранных.

Во введении обоснована актуальность решаемой проблемы, четко сформулированы цель и задачи исследования, показана новизна диссертационной работы, ее фундаментальная и практическая ценность, сформулированы положения, выносимые на защиту, показан личный вклад автора на всех этапах выполнения работ.

Изложенный на 24 страницах обзор литературы информативно и подробно освещает изучаемую проблему. В обзоре подробно описываются и сравниваются известные эффекты различных протоколов электрической стимуляции культур диссоциированных клеток мозга млекопитающих. Кроме того в обзоре приводится анализ современных методологических возможностей для культивирования нейронных сетей с упорядоченной топологией. Полученные в результате критического обзора представления позволяют автору четко сформулировать задачи и выбрать эффективные способы их решения. Большой объем проработанного при этом литературного материала, уверенное оперирование им, свидетельствует о том, что автор вполне умело ориентируется в современной научной литературе по изучаемой теме.

В главе «Объекты и методы исследования» подробно описаны используемые в работе современные электрофизиологические методы, а также методы культивирования клеток гиппокампа мышей в микрофлюидных чипах, совмещённых с микроэлектродными зондами, использованными автором в исследовании. Все это делает диссертационную работу с методической точки зрения очень передовой и интересной.

Собственные результаты, их обсуждения и выводы из диссертационной работы изложены в третьей главе на 44 страницах. Следует отметить чёткую логику выполнения и изложения этой экспериментальной части работы. В первую очередь автор провел изучение и описал влияния низкочастотной и высокочастотной стимуляции на динамику биоэлектрической активности нейронной сети. В результате этого исследования оказалось, что как высокочастотная, так и низкочастотная стимуляция вызывают изменения корреляции активности, регистрируемой в различных участках сети.

Затем, во второй части исследования автором оценивалось влияние стимуляции с обратной связью, которая, исходя из сведений в литературных источниках, предполагала направленное локальное воздействие на отдельную связь между двумя участками нейронной сети и достижение адаптивного результата. В результате этих экспериментов подтвердилась возможность достижения заданного уровня активности с использованием стимуляции с обратной связью в культуре диссоциированных нервных клеток, однако эффективность этого эффекта была низкая ($\leq 50\%$).

В связи с этим следующим шагом была разработка автором новой экспериментальной модели *in vitro* для исследования сетевой пластичности в первичной культуре нервных клеток - с направленной связью между двумя нейронными сетями. Для этого А.А. Гладковым было предложено оригинальное решение: использовать чипы с микроканалами ассиметричной формы для преимущественного роста аксонов в одном направлении от одной популяции клеток к другой. Благодаря направленной связи стало возможным определить ориентировочное расположение пре- и постсинаптических нейронов, связанных через аксоны в микроканалах чипа. Далее, автором было предложено стимулировать участки нейронной сети, соответствующие расположению пре- и постсинаптических нейронов в сконструированной связи с задержкой, соответствующей правилу STDP, соответствующему типу культивируемых нервных клеток. В результате, полученные данные показали эффективность применения разработанной экспериментальной модели для вызова функциональных изменений в культивируемой нейронной сети, полностью оправдав предложенный автором новаторский подход.

В разделе обсуждения автором проведен детальный анализ полученных результатов, их полноценная интерпретация в свете данных современной научной литературы.

В заключении кратко обобщены основные результаты исследования. Отдельный ценный материал, помещающий результаты работы в контекст других исследований в данной области, представляют собой Приложения к работе, в частности сравнительное сопоставление используемых в различных научных группах протоколов стимуляции культур, используемых типов клеток и способов оценки изменений работы нейронной сети после электрической стимуляции (Таблица 1).

По результатам исследования автором сформулировано четыре вывода, которые соответствуют цели и задачам работы и являются логичными и аргументированными.

В целом диссертация представляет собой завершённое научное исследование, а её оформление соответствует требованиям ВАК. Диссертационная работа написана хорошим литературным языком, легко читается, хорошо проиллюстрирована рисунками.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации.

Вопросы и замечания. В качестве непринципиальных замечаний, адресованных скорее к дальнейшему развитию этого актуального исследования, можно отметить следующее.

1. В настоящей диссертационной работе присутствуют как бы два разных идеологических полюса. С одной стороны, автор вполне обоснованно заявляет свою приверженность системному, сетевому подходу в понимании функций пластичности, обучения и памяти в нервной системе: «к настоящему времени сложилось понимание, что информационные функции мозга определяются свойствами нейронной сети, а не отдельных клеток» (с. 13). Об этом же свидетельствует и само название диссертации, посвященной именно сетевым закономерностям пластичности нейронных связей. И действительно, современные тренды изучения долговременной пластичности в нервной системе помещают эти вопросы в контекст формирования распределенного нейронного следа памяти – энграммы (см. например Josselyn et al., Finding engram. Nat Rev Neurosci., 2015; 16: 521-534). С другой стороны, при обсуждении результатов экспериментальной части работы те или иные сетевые изменения в результате воздействий рассматриваются автором скорее как негативные факторы

экспериментальных моделей, их недостатки, которые следовало бы устранить в более адекватных моделях: «Несмотря на воспроизводимость феномена достижения заданного уровня активности на основе стимуляции с обратной связью нейронных сетей первичной культуры гиппокампа в результате работы были выявлены следующие проблемы: ... Вызванный электрической стимуляцией эффект изменения импульсной активности наблюдался на всей сети, а не только на выбранном участке сети. Все эти выявленные недостатки протокола индукции заданного уровня активности не позволяли использовать данный протокол в качестве надёжной экспериментальной модели изучения вызванной стимуляцией пластичности в нейронной сети со случайной архитектурой связей *in vitro*.» (с 88-89). Было бы ценным сопоставить эти две различные концептуальные установки, проявляющиеся в разных частях работы, очертить их различия, оценить вытекающие из каждой из них особенности, достоинства и недостатки методических подходов к изучению пластичности нейронных сетей в культурах диссоциированных клеток.

2. Первый вопрос имеет и другое продолжение. Рассматривая недостатки методики индукции пластичности в нейронной сети со случайной архитектурой связей, в том числе и системные изменения во всей нейронной сети, автор отдаёт предпочтение модели нейронной сети с заданной направленной функциональной связью. Однако, как показывают экспериментальные данные (с. 93-95, рис 26 и 27) в этих культурах как спонтанные, так и вызванные пачки импульсов распространялись преимущественно в одном направлении, в обратном же направлении распространялось менее 20% сетевых пачек. В то же время известно, что одним из важных условий формирования энграммы в нервной системе *in vivo* является наличие прямых и обратных связей, систем повторного входа (*reentry*), механизмы реверберации, рекуррентного процессинга, которые, в частности, вовлекают необходимые для инициации долговременной пластичности NMDA глутаматные рецепторы. Не будет ли низкая представленность такого рода связей и механизмов процессинга информации препятствовать формированию биологически реалистичной пластичности в *in vitro* системах с заданной направленной функциональной связью?
3. Автором был найден удачный прием повышения индукции пластичности в нейронной сети со случайной архитектурой связей, при

котором адаптивный результат успешно достигался при использовании в модели индукции заданного уровня активности участков нейронной сети с относительно низкой исходной активностью. Однако перспективы использования такого подхода в дальнейших исследованиях в диссертации не обсуждаются. В связи с этим возникает вопрос - является ли по мнению автора этот прием одним из многообещающих новых способов индукции пластичности в нейронной сети со случайной архитектурой связей, который бы смог «выручить» это направление исследований?

4. Согласно данным настоящей работы, также, как и в исходных экспериментах Шахава и Марома, лишь около 50% экспериментов давали достижение заданного уровня требуемой активности. Автор справедливо рассматривает это как один из недостатков данной модели индукции пластичности. Однако конструктивным было бы также обсуждение и двух связанных с этим вопросов: а) возможность последующей работы и на таком проценте успешных случаев, особенно с учетом п. 3 (см выше) и б) обсуждение и анализ причин, по которым в 50% экспериментальных ситуаций эффект все же развивается (см. рис. 22). Известно, что и в ряде моделей обучения *in vivo* наблюдается существенная индивидуальная вариация в возможности достижения животным заданного критерия результата. Однако, именно случаи успешного обучения становятся далее объектом экспериментального исследования соответствующих нервных механизмов. Возможно, такой же подход мог бы оказаться рабочим и для индукции пластических изменений при протоколах с обратной связью в клеточных сетях *in vitro*?
5. В работе было установлено, что эффективным критерием для оценки функциональных изменений в нейронной сети оказался параметр «коэффициента изменения архитектуры связей» выявивший изменения как после низкочастотной, так и после высокочастотной стимуляции (Рис. 20 Г). В работе le Feber et al., *Repeated stimulation of cultured networks of rat cortical neurons induces parallel memory traces. Learn Mem.* 2015; 22(12):594-603 использовался еще один критерий изменения связанности в нейронной сети *in vitro* – «эвклидово расстояние между матрицами силы связей для всех пар регистрирующих электродов до и после стимуляции». С его помощью было выявлено изменение этого показателя как после низкочастотной стимуляции (0.2 Гц, на протяжении 15 мин), так и после высокочастотной тетанической стимуляции (100 Гц, 10 стимуляций с

интервалом 5 сек на протяжении 10-15 мин) (le Feber et al., 2015). В связи с этим полезно было бы более подробно обсудить сравнительные особенности, различия, достоинства и недостатки этих двух критериев.

6. В работе есть отдельные незначительные неточности или опечатки, которые безусловно неизбежны при оформлении результатов такого большого исследования, но никак не влияют на суть диссертационной работы.

Как уже говорилось, вышесказанные замечания не носят принципиального характера и не снижают качества и высокой научной значимости рассматриваемого диссертационного исследования.

Заключение. Диссертационная работа Гладкова Арсения Андреевича «Динамика вызванной активности нейронной сети культуры диссоциированных клеток гиппокампа мышей при электрической стимуляции» является законченной научно-квалификационной работой. В диссертации содержатся новые сведения, основанные на современных методах исследований и математической обработки данных. Диссертационная работа выполнена самостоятельно на высоком научно-исследовательском уровне, что свидетельствует о значительном вкладе автора решение актуальной научной проблемы в области физиологии - выявление закономерностей пластичности в нейронной сети. Содержание диссертации соответствует специальности 03.03.01 – физиология (биологические науки). Результаты исследований, изложенные в диссертационной работе, соответствуют «Положению о присуждении учёных степеней», утвержденному Постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (ред. от 29.05.2017 г.) «О порядке присуждения учёных степеней», пп.9-14.

Основные научные результаты диссертации опубликованы в рецензируемых ВАК журналах, что соответствует пп. 11-13 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (ред. от 29.05.2017 г.) «О порядке присуждения учёных степеней» и Перечню рецензируемых изданий, размещенному на официальном сайте Высшей Аттестационной Комиссии (ВАК) при Министерстве образования и науки РФ.

Диссертация полностью соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (ред. от 29.05.2017 г.) и включает

все необходимые элементы научно-квалификационной работы уровня кандидата биологических наук.

Таким образом, по актуальности, новизне, научной и практической значимости, объёму исследований, глубине анализа диссертационная работа полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённому Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а ее автор Гладков Арсений Андреевич заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата наук по специальности 03.03.01 – «Физиология».

Отзыв ведущей организации подготовлен чл.-корр. РАН, проф., д.м.н., зав. лабораторией нейробиологии памяти ФГБНУ «НИИНФ им. П.К. Анохина» Анохиным Константином Владимировичем, заслушан, одобрен и утверждён на заседании Лаборатории нейробиологии памяти ФГБНУ «НИИНФ им. П.К. Анохина», протокол № 24 от 21 ноября 2018 года.

Зав. лаб. нейробиологии
памяти ФГБНУ «НИИНФ
им. П.К. Анохина»
чл.-корр. РАН,
проф., д.м.н.

Анохин Константин Владимирович

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К.
Анохина» (ФГБНУ «НИИНФ им. П.К. Анохина»)

Адрес: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

тел.: +7(495)601-22-45.

E-mail: k.anokhin@nphys.ru, nphys@nphys.ru



«3» 2018 г.

Подпись Анохина К.В. заверяю:

НАЧАЛЬНИК
ОТДЕЛА КАДРОВ
БРАШОВ О.Б.