

УТВЕРЖДАЮ

Проректор - начальник Управления

научной политики

и организации научных исследований

МГУ имени М.В. Ломоносова

*Федянин* А.А. Федянин

«25» августа 2015 г.



### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Хоцкина Никиты Валерьевича по теме:  
«Пространственная память и обучение у мышей, различающихся по  
предрасположенности к наследственной каталепсии: влияние  
нейротрофического фактора мозга BDNF», представленную на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.03.01 – Физиология

Диссертационная работа Н.В. Хоцкина, посвященная анализу особенностей обучения у мышей с генетической предрасположенностью к каталепсии, относится к категории междисциплинарных, поскольку автор провел исследования способности к обучению (с разработкой принципиального улучшения в регистрации поведения) в сопоставлении с полученными им данными по экспрессии в мозге ряда важных для функции ЦНС генов.

Каталепсия – это, безусловно, патологическое состояние ЦНС и психики человека. Заболевание выражается в специфическом изменении мышечного тонуса и является одним из крайних состояний на гипотетической «оси»,

противоположный конец которой занимает состояние полной мышечной ригидности – кататонического ступора. В виду важности получения новых знаний по механизмам каталепсии, очевидно стремление исследователей создавать лабораторные модели, которые позволили бы проанализировать физиологические, генетические и молекулярные механизмы, лежащие в основе этого заболевания человека. Одной из таких моделей является «щипковая» каталепсия мышей (рефлекторное развитие каталептического состояния в ответ на тактильную стимуляцию кожи загибка животного). Модель уже давно разрабатывается в ИЦиГ СО РАН и активно используется для фармакологического и молекулярного анализа не только проявления каталепсии, но и особенностей ряда нейротрансмиттерных систем мозга, включая состояние системы серотониновых рецепторов. Очевидно, что современное состояние генетики позволяет создавать более точные и более хорошо охарактеризованные модели патологических состояний ЦНС, что в полной мере относится и к моделированию состояния каталепсии. В русле таких представлений в ИЦиГ были созданы две новые линии, одна из которых была получена методом классической селекции, когда гибридных мышей, носителей признака «щипковая каталепсия» (от линии СВА) многократно скрещивали с не-каталептической линией АКР с тестированием наличия признака у потомков. Полученная линия имела высокую долю «генетического» фона устойчивой к каталепсии линии, но обнаруживала каталепсию. Далее, на основе картирования главного гена «щипковой» каталепсии была создана еще одна линия, которая содержит фрагмент хромосомы 13 мыши, полученный от каталептической линии СВА. Главный локус каталепсии, расположенный в 106-116 м.п.о. фрагменте хромосомы 13, был перенесен из генома СВА в геном АКР, и была создана рекомбинантная линия АКР.СВА-D13Mit76. Около 50% мышей этой линии проявляют предрасположенность к каталепсии. Исследование особенностей молекулярной организации этого фрагмента хромосомы 13 (и, видимо, его взаимодействия с геномом линии АКР), а также поведения этих животных и

было предметом исследования Н.В. Хоцкина, составившего рецензируемую диссертацию.

Актуальность данной работы заключается в дальнейшем экспериментальном анализе новой генетической модели каталепсии (конгенной линии с участком хромосомы 13, перенесенным на некаталептическую линию), что позволяет делать важные теоретические выводы о связи генетических элементов, определяющих каталепсию с процессами воспаления, а также с функцией мозговых трофических факторов. Соединение в одном исследовании данных по поведению мышей разных линий с анализом экспрессии генов «системы воспаления» - также является несомненно положительным моментом данной работы. Такой синтез подходов соответствует современным тенденциям к междисциплинарным исследованиям.

Диссертационная работа Н.В. Хоцкина важна и в научно-практическом аспекте. Подробная характеристика особенностей научения в видоизмененном теста Мориса, а также особенности экспрессии генов BDNF и провоспалительных нейрокинов важны для проведения дальнейших исследований и экспериментально каталепсии, и других патологических состояний ЦНС. Такая подробная характеристика генетической модели каталепсии должны использоваться и в научно-исследовательских целях и в практических целях формирования знаний будущитх специалистов (бакалавров и магистров) в области нейрогенетики. Это означает, что полученные в работе Н.В. Хоцкина данные могут быть использованы при чтении спецкурсов по нейрогенетике и генетике поведения в университетах Новосибирска, Москвы, С-Петербурга и др.

Диссертация Н.В. Хоцкина представляет собой оригинальное экспериментальное исследование, в котором получены данные, пополняющие наши знания о физиологических и молекулярно-генетических особенностях каталепсии, точнее «щипковой» рефлексорной каталепсии мышей. Следует также отметить, что рецензируемая диссертация – это фрагмент большой

исследовательской работы, которая проводится в этом направлении в Институте цитологии и генетики СО РАН.

Диссертация Н.В. Хоцкина построена в соответствии с традиционным планом и состоит из введения, обзора литературы, методической главы, результатов экспериментов, обсуждения полученных данных, выводов и списка цитированной литературы (163 источника). Общий объем составляет 84 машинописных листа. Работа включает 9 оригинальных рисунков и одну таблицу.

Во введении четко обоснованы и цели исследования, и необходимость решения поставленных задач.

В обзоре литературы, несколько амбициозно озаглавленном «Обучение и память в норме и при патологии» автор на 23 страницах последовательно рассматривает общие взгляды на классификацию обучения (которая в интерпретации Н.В. Хоцкина сильно отличается от общепринятой), описывает основные данные по механизмам краткосрочной памяти и (в общих чертах) –<sup>4</sup> долговременной памяти. Следует отметить, что автор специфически оценивает феномен пространственной памяти, считая, что этот феномен «...сохраняет информацию о пути животного в пространстве», что является упрощенной, а потому неадекватной, трактовкой формирования у животного пространственных представлений (карты пространства). В связи с этим было бы правильно увидеть несколько другое название диссертации. Апелляция автора к взглядам Э. и М. Мозеров в данном контексте (в связи с «непространственной» версией обучения в лабиринте Морриса) выглядит необоснованной. Отдельный подраздел обзора посвящен тесту водного лабиринта Морриса, по которому также можно сделать замечание, поскольку автор не разграничивает усвоение пути к невидимой платформе, как формирование инструментального навыка, от принципиально другого по своим механизмам формирования «карты пространства». Автор, в частности, утверждает, что тест водного лабиринта Морриса представляет собой «классический «проблемный ящик» Торндайка, и что этот тест подходит для

количественного описания обучения у животных с помощью «кривых научения». Это вызывает некоторое недоумение, поскольку исследователи пространственного обучения и памяти имеют принципиально другие взгляды на этот феномен, базирующийся на огромной эмпирической базе. Такое расхождение с традиционным подходом прослеживается и в экспериментальной схеме, использованной в работе. Следует отметить, что автор вправе не соглашаться с традиционно принятыми представлениями по данному вопросу, но ему следовало бы обосновать отстаиваемое им положение более подробно и придерживаться общепринятой терминологии. Далее в обзоре литературы кратко и достаточно четко характеризуется экспериментальные данные по физиологии, нейрохимии и молекулярной генетике феномена «щипковой каталепсии». К сожалению, автор не касается аналогичных данных по нейролептической и «постиктальной» формам каталепсии. Обзор данных по серотониновой системе мозга автор ограничил только ее общим описанием и описанием данных по полиморфизму <sup>5</sup> триптофангидроксилазы-2 (в связи с анализом в работе поведения у двух линий с разными формами этого фермента). Отдельные разделы обзора посвящены общим сведениям о роли провоспалительных факторов и BDNF в процессах обучения и памяти с акцентом на данных, полученных в экспериментах с водным лабиринтом Морриса.

В разделе “Материалы и Методы” описаны использованные в работе экспериментальные подходы. Четко и квалифицированно представлены методические разработки автора в связи с предлагаемым методом регистрации движений животного в тесте Морриса. Следует, к сожалению, отметить, что использованный автором протокол обучения животных (как уже отмечалось) не может быть назван методом пространственного обучения. В экспериментах автора животное выпускали всегда из одного пункта периметра бассейна, а не из разных, как предполагает изначальный протокол пространственной версии этого теста (в таких случаях животное плывет к платформе, используя отдаленные ориентиры). Кроме того автор не нашел возможным привести в



диссертации доли животных разных генотипов, которые не решали тест, т.е. которых «подсаживали» на платформу. Кроме того, число предъявлений теста, использованное в работе, явно недостаточно для прочного усвоения этого инструментального навыка.

Подробно и четко изложены методы тестирования экспрессии исследованных в работе генов. Следует отметить, что проведение наблюдений за поведением мышей в опытах с обучением возражений не вызывает, что отвечает строгим требованиям современного эксперимента. Полученные в работе экспериментальные данные обработаны статистически с использованием адекватных методов. Не вызывает сомнений достоверность полученных в работе экспериментальных данных.

Целью работы Н.В. Хоцкина было изучение связи способности к обучению и формированию пространственной памяти с наследственной предрасположенностью к каталепсии, а также с уровнем экспрессии провоспалительных цитокинов в мозге и BDNF и активностью триптофангидроксилазы 2 в мозге мышей, двух линий, различающихся по полиморфизму TRD-2. Следовало также дать оценку эффектов внутрижелудочкового введения BDNF у мышей–каталептиков линии, конгенной линии AKR. Конкретные экспериментальные задачи, стоявшие в связи с этими целями, изложены четко и автор, при изложении работы, четко следует этому плану.

Важной и новой для исследований поведения лабораторных животных в водном лабиринте Морриса является разработка принципиально нового способа регистрации движений животного в «проходящем свете», что снимает трудности, связанные с необходимостью тестирования мышей и крыс альбиносов (которым в традиционных опытах обычно подкрашивают черным цветом шерсть на загривке). Эта методика практически важна, поскольку водный лабиринт Морриса активно используется, в частности, для доклинических испытаний новых лекарственных препаратов разных групп. С этой частью работы автор успешно справился, и она не вызывает замечаний.

Следующая задача исследования состояла в сопоставлении способности к усвоению навыка достижения подводной платформы у мышей АКР, СВА и АКР.СВА-D13Mit76. «Пространственная» версия теста Морриса подразумевает использование комплекса "внелабиринтных" дистантных ориентиров. Если в такой ситуации животные запоминают место платформы (т.е. используют дистантные ориентиры), когда их выпускают плыть из разных точек периметра, то тогда тестовая попытка выявляет предпочтение целевого квадранта. Если же используют версию, когда животное запоминает расстояние от борта, повороты, круговые маршруты и т.п., то при обучении будет выявляться снижение латентного периода нахождения платформы (переход от беспорядочного - к упорядоченному поиску), но предпочтения целевого квадранта не будет. Такое "улучшение" можно увидеть даже при полном удалении гиппокампа. Как известно, принципиальным различием в усвоении пространственного навыка от непространственного заключается в том, что в первом случае животное использует аллоцентрическую стратегию, тогда как при инструментальном обучении (которое имело место в экспериментах автора) используется эгоцентрическая стратегия.

Поскольку в версии эксперимента, использованной в работе Хоцкина, анализировалось не пространственное обучение, а формирование условно-рефлекторного навыка достижения платформы, то наиболее информативный показатель пространственного обучения – пребывание (время и путь) мыши в том квадранте (не «четверти», как пишет автор) бассейна, где находилась целевая платформа, не может быть индикатором успешности обучения. На деле и оказалось, что усвоение места расположения платформы у мышей всех трех линий было одинаковым, это четко продемонстрировано в экспериментах. В то же время мыши каталептической рекомбинантной линии АКР.СВА-D13Mit76 медленнее плыли к платформе, и их путь к ней был длиннее. Эти данные указывают на сниженную способность к обучению мышей конгенной каталептической линии именно инструментальному навыку, но не более слабому обучению «в тесте лабиринта Морриса», т.е. пространственному навыку *per se*.

Проявляющийся в экспериментах эффект научения (т.е. обнаруженный животными невысокий по проявлению навык) не имеет истинно «пространственной» компоненты. Таким образом, вывод 2 диссертации, в котором утверждается, что «у мышей рекомбинантной линии АКР.СВА-D13Mit76 с наследственной предрасположенностью к каталепсии выявлены *существенные нарушения* в процессе обучения в тесте водного лабиринта Морриса по сравнению с родительскими линиями АКР и СВА» выглядит тенденциозно, поскольку обнаруженные отличия не могут быть названы «существенными». В работе не представлены данные о доле животных каждой линии, которые не находили платформу в использованной (сильно упрощенной) версии теста Морриса, что также было бы характеристикой успешности обучения у мышей разных генотипов. Таким образом, различия в обучаемости инструментальному навыку показаны не по успеху отыскания платформы за данный период времени, а только по более менее информативным «динамическим» характеристикам отыскания платформы (без указания, сколько мышей этот навык освоили).

Как в линиях СВА и АСC (полученных при классическом поглотительном скрещивании), так и в рекомбинантной линии АКР.СВА-D13Mit76, по данным лаборатории, каталепсию обнаруживает только 50% животных. Это является проявлением сложной генетической детерминации этого признака (и свидетельствует о роли генов-модификаторов в этом феномене). Очевидно, что 50% представленность каталептического фенотипа в выборках мышей СВА и АКР.СВА-D13Mit76 (всего было по 10 животных) может повлиять на оценку обучаемости мышей этих линий, однако в диссертации этот вопрос, к сожалению, и не затрагивается, и не обсуждается. Даже если предположить, что каталепсия не проявлялась у 40% (даже не у 50%!) мышей, то данные по 6 мышам с каталепсией (из выборки в 10 мышей) могут быть недостаточными для уверенного суждения о связи обучаемости с каталепсией.

Исследование возможной связи между уровнем мРНК генов *Il-1 $\beta$* , *Il-6*, *Vdnf* и успешностью обучения навыку отыскания платформы дало четкие результаты.



Межлинейных различий в уровне экспрессии генов *Bdnf* и *Il-1β* в коре и *Bdnf* в гиппокампе (хотя в работе не дано пояснений, почему не определяли экспрессию этих генов в стволе и стриатуме, т.е. в структурах, связанных с проявлением каталепсии). В то же время уровень экспрессии гена *Il-1β* в новой коре у каталептических линий была выше, чем у мышей АКР.

В то же время в экспрессии мРНК *Il-6* обнаружилось значительное и достоверное межлинейные различия как в новой коре, так и в гиппокампе, причем у мышей рекомбинантной линии он был выше, чем у обеих родительских линий. Этот факт автор сопоставляет с несколько менее успешным обучением мышей этой линии в проведенных им экспериментах, считая, что это указывает на ассоциацию каталепсии с провоспалительным агентом, несмотря на то, что различия рекомбинантной линии по этим показателям обнаруживались и по сравнению с каталептической линией СВА.

В серии экспериментов с однократным введением экзогенного BDNF в боковые желудочки было обнаружено достоверное улучшение отыскания платформы у мышей линии АКР.СВА-D13Mit76. К сожалению эти эксперименты проводились только с рекомбинантной линией мышей, и у другой линии (ни у СВА, ни у АКР) эффект введения этого нейротрофина не оценивался, что не позволяет говорить о специфичности эффекта BDNF на каталептическую линию АКР.СВА-D13Mit76. Это не позволяет согласиться с автором, что данный результат свидетельствует о перспективности BDNF для лечения нейродегенеративных расстройств. Для такого вывода данный экспериментальный материал явно недостаточен.

Автор также четко показал отсутствие отличий в обучаемости инструментальному навыку отыскания платформы у мышей двух специально выведенных линий мышей с разными формами гена триптофангидроксилазы 2, т.е. у мышей конгенных линий В6-1473С и В6-1473G. Это важный факт для оценки роли серотонинергической системы мозга в реализации инструментального обучения, поскольку серотонин (и, соответственно, темпы

его синтеза в мозге) играет значительную роль в разных сферах поведения лабораторной мыши.

Таким образом, несмотря на значительный массив экспериментальных данных, полученных Н.В. Хоцкиным, его диссертационная работа не свободна от достаточно серьезных недостатков. Основной смысл замечаний заключается в том, что у линии АКР.СВА-D13М, а не «пространственного обучения». Отметим, что в целом, число предъявлений для инструментального научения в экспериментальных сериях было небольшим, поскольку обычно для этого требуются десятки предъявлений. В то же время автор говорит о различиях в *пространственном обучении* и о связи этого феномена с каталепсией. Экспериментальные данные (достаточно убедительные и представленные на хорошем профессиональном уровне) свидетельствуют, что этих различий явно недостаточно для суждения об отрицательном влиянии предрасположенности к каталепсии, поскольку мыши каталептической линии СВА отличались от «рекомбинантных» также, как и мыши некаталептической линии АКР. В то же <sup>10</sup> время убедительные свидетельства ассоциации каталепсии с экспрессией провоспалительных факторов (в особенности в новой коре) должны были бы направить анализ результатов на возможную пространственную (внутрихромосомную) ассоциацию генов, влияющих на каталепсию и генов, связанных с системой развития воспаления. Это уже было частично показано в более ранних работах лаборатории, где работает автор.

В работе много опечаток, грамматических ошибок и неудачных выражений типа «случайного шанса» или «самая экспансивная медиаторная система» и др.

Следует, однако, отметить, что несмотря на значительные замечания к интерпретации данных, полученных в диссертации Н.В. Хоцкина, работа выполнена на хорошем методическом уровне, показывает высокую квалификацию автора в разработке технологических нововведений для регистрации поведения, отражает его владение современными методами исследования и методами статистики, что позволяет положительно оценить

диссертацию и указать на ее соответствие требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Исследование генетической регуляции поведения, в частности на генетических моделях нейродегенеративных заболеваний человека (риск развития которых в последнее время возрастает), является в настоящее время приоритетным направлением нейробиологии в целом и физиологии высшей нервной деятельности, в частности. Исследования генетической компоненты многих нейродегенеративных заболеваний, модели которых на лабораторных животных успешно разработаны, важны и могут быть использованы и для исследования физиологии обучения (Ин-т высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН), и для анализа когнитивных процессов, а также патологических отклонений от нормального поведения (Ин-т нормальной физиологии РАН, Институт фармакологии РАН, МГУ имени М.В. Ломоносова). В этом плане полученные в работе Н.В. Хоцкина данные должны быть аккумулированы и использованы в экспериментальных исследованиях этих учреждений.

Тщательный анализ диссертационной работы Н.В. Хоцкина на тему: «Пространственная память и обучение у мышей, различающихся по предрасположенности к наследственной каталепсии: влияние нейротрофического фактора мозга BDNF» позволяет заключить, что она соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор, Н.В. Хоцкин, достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 Физиология.

Отзыв утвержден на заседании кафедры высшей нервной деятельности Биологического ф-та МГУ имени М.В. Ломоносова 26 августа 2015 г, протокол № 6.

Сведения о ведущей организации:

1. Полное наименование: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»
2. Сокращенное наименование: Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, МГУ имени М.В.Ломоносова, или МГУ
3. Почтовый адрес: 119234, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1
4. Юридический адрес: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1
5. Телефон (495) 939-27-29, Email: info@rector.msu.ru

Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, звание - старший научный сотрудник,

Полетаева И.И.

Ученый секретарь кафедры высшей нервной деятельности Биологического ф-та МГУ имени М.В. Ломоносова, доктор биологических наук, профессор

Данилова Р.А.

Заведующий кафедрой высшей нервной деятельности, доктор биологических наук, профессор

12

Латанов А.В.

