



**МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
(МГУ)**

Ленинские горы, Москва, ГСП-1, 119991
Тел.: 939-10-00, Факс: 939-01-26

12.05.2016 № 659-16/013-03

На

№

УТВЕРЖДАЮ

Проректор –
начальник Управления научной
политики и организации научных
исследований

МГУ имени М. В. Ломоносова

А.А. Федянин

2016



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Смагина Дмитрия Александровича
на тему: «ПОВТОРНЫЙ ОПЫТ АГРЕССИИ И ПОСЛЕДСТВИЯ ЕЕ ДЕПРИВАЦИИ У
САМЦОВ МЫШЕЙ: ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ И
НЕЙРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ, представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 03.03.01- физиология

Диссертационная работа Д.А. Смагина, посвящена нейрофизиологическому анализу особенностей проявлений агрессии и влияния опыта агрессии на другие формы поведения, а также на нейрогенез взрослого мозга у лабораторных мышей. В этой работе достаточно разностороннему анализу был подвергнут нейрофизиологический статус самцов мышей при средовой модуляции их агрессивного поведения.

Исследование нейробиологических основ формирования устойчивой повышенной агрессивности у лабораторной мыши необходимо для поиска путей коррекции патологической агрессии человека. Это свидетельствует об актуальности исследования Д.А. Смагина. Агрессивность - это особое психоэмоциональное состояние, предрасполагающее к аверсивным реакциям, направленным на особей своего или чужого вида. В виду важности получения новых знаний по механизмам агрессии необходимо не только создавать лабораторные модели этого состояния, но проводить детальную оценку

их адекватности. Важно отметить, что проявления агрессивного поведения, которые можно наблюдать у животных, находятся, как правило, в пределах «поведенческой нормы реакции» вида, поэтому они, теоретически, не могут моделировать состояние патологической агрессии человека. Это обстоятельство только подчеркивает важность и адекватность модели агрессивного поведения, использованной в данной диссертации, поскольку при этом у животного формируется патологическое состояние, практически не встречающееся в условиях нормальной жизни лабораторных животных. Модель формирования устойчивой патологической агрессии лабораторных мышей, созданная Н.Н. Кудрявцевой, продуктивно используется в ИЦиГ СО РАН. Она оказалась информативной не только в поиске путей модуляции этого состояния, но и для ценки особенностей ряда нейротрансмиттерных систем мозга.

Предметом исследования Д.А. Смагина, составившего его диссертационную работу, были изменения, которые происходят в поведении мышей с патологической агрессией в условиях, когда животные находятся в состоянии депривации от возможности провести активное нападение на конспецифика. Таким образом, целью работы было изучить особенности изменения поведения и психоэмоционального состояния у самцов мышей, у которых был сформирован «опыт агрессии» после периода такой депривации. Кроме этого, в целях автора работы было оценить состояние активации клеток зубчатой извилины гиппокампа и базолатерального ядра миндалевидного комплекса, а также проанализировать интенсивность пролиферации в субгранулярной зоне зубчатой фасции на разных стадиях эксперимента.

В качестве объекта исследования были выбраны мыши самцы линии C57Bl/6J. Сформулированная цель исследования поставили перед автором необходимость выяснения особенностей поведения тревоги, исследовательской активности и агрессивности у животных с разным «объемом» опыта повторных агрессивных столкновений, проанализировать может ли агрессивность мышей, которая оказалась усиленной после депривации, измениться при создании у них конкурирующих мотиваций (реакции на р-р сахарозы и на пребывание с самкой), а также оценить эффективность фармакологических вмешательств, которые, предположительно, могли бы снизить агрессию. Отдельными задачами исследования была оценка уровня активации клеток мозга по ходу формирования устойчивой агрессивности и при депривации, а также возможные изменения в темпах нейрогенеза взрослого мозга. Указанные выше задачи работы были выполнены с получением новых экспериментальных данных.

Данное исследование имеет, несомненно, важное теоретическое значение как работа, пополняющая знания о механизмах агрессивного поведения. В плане современных

представлений о нейрофизиологических механизмах агрессии автор показал условную эффективность и неэффективность ряда средовых и фармакологических подходов в попытках модуляции устойчивых проявлений патологической агрессии. Оценивая возможные практические аспекты данного исследования, следует отметить, что экспериментальный подход, позволяющий исследовать процесс формирования патологической агрессии (на примере повторного опыта агрессии у самцов мышей), важен как новая и в большой степени адекватная модель патологии поведения. Пополнение сведений о ее нейрофизиологических свойствах (полученные в рецензируемой диссертации Д.А. Смагина) важно, поскольку это несомненно будет использовано в разработке адекватных способов фармакологической коррекции аномалий ЦНС и поведения. Аномальная агрессия, как один из симптомов патогенеза многих психоэмоциональных и неврологических заболеваний, остается важной проблемой клиник. Несомненна практическая значимость возможности моделировать это состояние в экспериментах на животных с целью поиска коррекции таких отклонения.

Научно-практический аспект работы Д.А. Смагина, как фрагмента экспериментальных исследований патологической агрессии, заключается также и в том, что подробный анализ патологии ЦНС важен для формирования знаний молодых специалистов – бакалавров, магистров и аспирантов. Полученные в работе данные должны стать частью информации спецкурсов по нейрогенетике и генетике поведения в университетах Новосибирска, Москвы, С-Петербурга и др.

Четко сформулированные автором «Положения, выносимые на защиту» позволяет положительно оценить разнообразие экспериментальных приемов использованных в работе.

План построения диссертации Д.А. Смагина несколько отличается от традиционного. После «канонических» Введения и Обзора литературы следует большая по объему глава Материалы и методы, которая включает в себя ряд самостоятельных разделов. Это не просто перечисление использованных методик, а подробное обоснование каждого из использованных экспериментальных подходов (со ссылками на первоисточники). В целом, такое построение данного раздела работы оправдано, поскольку методическое разнообразие диссертации было бы трудно изложить по-другому. Обсуждение результатов автор также дает в каждом из разделов Результаты, а общее обсуждение (которое почему-то озаглавлено «Общая дискуссия») весьма лаконично. В то же время выводы, наоборот, достаточно и нетрадиционно пространны, что следует отнести к недочетам работы.

Во введении автор дает четкое обоснование и целей исследования, и необходимость решения поставленных задач. Следует сразу отметить, что и в этом разделе, и в обзоре литературы уделяется много внимания и дается много ссылок на работы по агрессивности человека. Разумеется, такие отсылки необходимы, и как обоснование работы, и для оценки важности проблемы. Однако из авторского текста следует, что он рассматривает сложнейшее явление – агрессию человека - слишком упрощенно. Известно, например, что понятие «агрессия» не всегда применимо к ситуации военных действий, где мотивы поведения людей часто бывают далеки от агрессивности *per se*, а диктуются причинами социальными и политическими. Такое смешение представлений об агрессии заставляет считать подобные сопоставления не достаточно корректными.

Обзор литературы, изложенный на 32 страницах, содержит 7 подразделов, в которых последовательно рассматриваются: общее описание феномена агрессии и разные классификации агрессии, описываются основные модели агрессивности на животных, нейроанатомический субстрат этого поведения, феномен повышенной агрессивности, «эффект победителя» и влияние повторного опыта побед в агрессивных столкновениях на поведение.

В тех разделах обзора литературы, где описываются разные подходы к подразделению феномена «агрессия» на разные категории, автор также постоянно обращается к описанию проявлений агрессии человека, и к этим «параллелям» относится и выше изложенное замечание. Кроме того, в пределах одного абзаца, в последовательных фразах автор то говорит об агрессии человека, то об агрессивности лабораторных грызунов. Это создает трудности восприятия материала. Следовало бы в отдельном разделе привести данные по исследованию агрессивности человека, что позволило бы затем более четко сравнивать их с данными по животным. Такое недифференцированное изложение данных по человеку и животным нельзя назвать удачным. Недостаточно внимания автор уделяет и данным по роли обоняния (и обонятельных сигналов) в индукции и контроле агрессивности грызунов. Неясно также, почему столь важный для выживания животного и подробно изучаемый в настоящее время признак как «агрессия страха» практически автором не упоминается, хотя эксперименты по оценке тревожности он проводил.

Д.А. Смагин обоснованно затрагивает вопрос о том, что повторный опыт агрессивных победоносных столкновений является положительным подкреплением. Однако терминологически правильнее было бы говорить о подкрепляющих свойствах побед в таких поединках, а не об агрессии, как таковой.

В разделе о нейроанатомическом субстрате агрессии также не всегда ясно, о каких данных идет речь – о данных МРТ на человеке, или об экспериментах на животных. Отметим также неправильное наименование структур мозга - упоминающее автором «ядро ложа конечной полоски» (устоявшийся и общепринятый термин) именуется автором совсем иначе, а преоптическая область промежуточного мозга дается как «предзрительное поле». Это следует учесть автору в его дальнейшей работе. В целом, в этом разделе обзора материал дан достаточно квалифицированно, хотя некоторые выражения (например, «фронтальная кора участвует в торможении нервных процессов в гипоталамусе») отражают несколько поверхностную оценку данных литературы. Раздел обзора, посвященный нейрохимическим особенностям в проявлении агрессивного поведения – добротная сводка данных, хотя упоминание о «недавних» работах, ссылаясь на статью 2005 года – это проявление некоторой небрежности. В разделе о феномене повышенной агрессивности также основное внимание уделяется описанию данных на человеке (которые неизбежным образом оказываются фрагментарными), затем автор зачем-то снова возвращается к обоснованию важности моделирования агрессии в эксперименте для решения клинических задач. Изложение материала в этом разделе нельзя назвать удачным. Оценка данных о влиянии опыта побед и поражений на поведение лабораторных грызунов (отдельный раздел обзора литературы) квалифицированная сводка по этим вопросам. Изложенные данные являются обоснованием разработки и успешного использования созданного Н.Н. Кудрявцевой подхода к формированию устойчивого агрессивного поведения у самцов мышей. Краткое описание данных по поведению мышей в вышеуказанных экспериментах – необходимая предпосылка изложения собственных материалов автора.

Отправной точкой исследований диссертации было обнаружение по-прежнему высокого уровня агрессивности у самцов, которые в течение 14 дней не имели опыта агрессивных конфронтаций с соперником. Сохранение высокой агрессивности этих животных не сопровождалось изменениями в уровне локомоторной активности и в ряде показателей тревожности. Уровень агрессивности этих самцов был достоверно выше, чем таковой у животных с 20-дневным опытом агрессивных конфронтаций. Экспериментальный факт усиления агрессивности после депривации не вызывает никаких сомнений в его достоверности. В то же время в работе практически нет контрольной группы, в которой животные пребывали бы в другой клетке, а не в клетке с перегородкой. Усиление агрессивности имело место у 2/3 экспериментальных животных, однако при описании дальнейших экспериментов остается неясным, по

каким животным представлены данные – по всей группе или только по тем мышам, у которых агрессия усилилась. Это относится к ряду экспериментов и в следующих частях работы. В тесте «перегородка» у «депривированных» самцов произошло снижение времени, проведенного у перегородки, что автор объясняет тем, что «перегородка перестала быть условным стимулом приближающихся атак». Такое объяснение требует экспериментального подтверждения, а поскольку его не было (но оно и не входило в цели работы) следовало бы дать более простое объяснение этому факту, а именно, что у этих животных произошло неассоциативное обучение. Этот процесс - привыкание к данной обстановке, феномен иной, чем формирование ассоциации между деталью обстановки и состоянием животного (классический условный рефлекс). Можно полагать, что появление за перегородкой нового партнера (по прекращении депривации) было недостаточным, чтобы этот эффект привыкания перестал обнаруживаться. Следовало бы также проанализировать возможную роль обонятельных сигналов в этом феномене. По изменению ряда показателей теста ПКЛ автор заключает, что у депривированных животных сохранилась повышенная тревожность, что, видимо, соответствует действительности и является еще одним из доказательств не очень высокой информативности этого теста.

Эксперименты следующих серий показали, что попытки изменить уровень агрессивности депривированных самцов путем предоставления им возможности пить р-р сахарозы или путем содержания их вместе с самками были неэффективными. Эти достаточно оригинальные эксперименты показали, что создание «конкурирующей» мотивации (стремление к сладкому и полового мотивация) оказались недостаточными для модуляции агрессивности этих животных. Это лишний раз свидетельствует, что модель длительных агрессивных конфронтаций (даже с последующей депривацией контактов) является уникальной моделью истинной патологической агрессии. Эта модель должна быть активно востребована для пред-клинических исследований новых препаратов. Следует, однако, заметить, что в объяснении влияния приема сахарозы на агрессию мышей автор ищет и на пути возможного влияния создания альтернативной мотивации, формирующейся при приеме сахара, и в оценке энергетических последствий поступления в организм сахарозы. В то же время, для исключения второй группы объяснений достаточно было бы использовать р-р сахара, а не сахарозы. Эксперименты по пребыванию депривированных самцов с самками четко показали сохранение повышенной агрессии, и этот факт также важен для оценки относительной силы двух мотиваций. Однако автор не дает никакой информации относительно того, каким было поведение самцов по отношению к самкам в период их совместного

содержания. Известно, что у мышей патологически усиленная агрессивность иногда сопровождается агрессией, направленной на самок. Не дается также и данных наблюдений по частоте садок за начальный период их совместного содержания (и/ или по развитию у самок беременности). Не указано также подсаживали самок к контрольным самцам. Выражение «пребывание в комфортных условиях с самками» выглядит несколько антропоморфично. В целом результаты этих больших серий экспериментов с тестированием опытных и контрольных животных в батарее тестов выглядят убедительно и демонстрируют изменения в поведении, которыми сопровождается лишение самцов возможности реализовать агрессивное поведение на фоне резко усиленной агрессивной мотивации.

Фармакологические эксперименты, проведенные Д.А. Смагиным, также имели целью анализ особенностей патологической агрессии у мышей. Вальпроат натрия – препарат, действие которого связано с модуляцией состояния ГАМК-ергической системы, снижал агрессивность мышей, у которых была сформирована патологическая агрессивность. Автор отмечает появление у животных «состояния неподвижности» при высокой дозе препарата, однако не указывает, в какой степени это состояние сходно или отлично с состоянием «замирания», входящим в видоспецифический репертуар поведения грызунов. Вальпроат – одно из мощных противосудорожных средств, что следовало бы проанализировать, оценивая результаты этой серии.

Следует также отметить, что этих экспериментах была выявлена неоднородность реакций мышей линии C57Bl на введение препарата. Эта неоднородность может иметь объяснением влияние вальпроата на состояние ацетилирования-деацетилирования генов, которые неизбежным образом активируются (или ингибируются) в период формирования патологической агрессивности. В целом данные этой серии опытов информативны и не вызывают серьезных замечаний. Они важны и как данные по эффектам вальпроата, и как комплекс сведений для проведения новых исследований.

Однократное (но не хроническое) введение налтрексона самцам мышей после периода депривации вызвало достоверное снижение агрессивности, тогда как «превентивное» его введение (в период формирования опыта повторных побед) не имело такого эффекта, как не влиял этот препарат и на самцов с агрессивным поведением, но без периода депривации. Эти данные, еще раз иллюстрирующие сложность изучаемого феномена, также могут быть отправной точкой для будущего исследования.

Хроническое введение хлорида лития во время агонистических взаимодействий имеет четкий анксиогенный эффект. Если же препарат вводили во время депривации то

его действие оказалось анксиолитическим. В то же время антиагрессивного действия лития выявлено не было. Можно полагать, что формирование опыта побед в конфронтациях вызывает к жизни серьезные изменения в работе ЦНС, затрагивая и состояние активации-торможения многих рецепторных систем и, возможно, молекулярно-генетические процессы. Следует отметить, что по некоторым данным эффект лития (по крайней мере частично) развивается путем его воздействия на трансдукцию сигнала через GPCR путь с вовлечением NMDA рецепторов и системы оксида азота (Ghasemi, Dehpour, Trends Phar. Sci., 2011, 32,420). Это, по-видимому, отражает очень разнообразные пути его влияния на ЦНС и может быть причиной разнообразных и сложных эффектов, полученных в данном исследовании.

В диссертационной работе Д.А. Смагина описаны результаты проведенных экспериментов по нейрогенезу в субгранулярной области зубчатой фации гиппокампа у мышей разных групп.

Впервые показано, что при повторном опыте агрессии усиливается пролиферативная активность в этой зоне – у мышей со сформированной агрессивностью новых клеток было больше, чем в контроле, а депривация этот показатель не восстанавливает. Оценка числа активированных клеток в этой структуре (по экспрессии гена *c-fos*) показала, что по ходу формирования патологической агрессивности их число растет до 10-го дня, но затем – падает, при этом в период после депривации их было меньше, чем в других группах. Эти данные очень интересны, хотя достаточно убедительной их трактовки пока не существует.

Сходная динамика числа активированных клеток по ходу формирования патологической агрессивности была показана в миндалине, хотя в этой структуре данный показатель восстанавливается до уровня контроля после периода депривации. Эти данные также являются новыми и также не могут сегодня получить должной интерпретации. Объяснение этого эффекта, приводимое автором («изменения нейрональной активности аккумулируются с приобретением положительного опыта побед») не выглядит убедительным.

К этой части работы следует сделать также следующие замечания: 1) выявление клеток, экспрессирующих *c-Fos* белок, означает их активацию, однако следует помнить, что активированными могут быть и тормозные нейроны, или вставочные нейроны, передающие сигналы в другие участки мозга – этот аспект ускользнул от внимания автора; 2) по какой-то причине автор сконцентрировал внимание на активации клеток в вентро-медиальном ядре миндалины, хотя с точки зрения функции этой структуры особенности активации клеток в центральном ядре не менее, а, может

быть и более информативны, поскольку в большей степени связаны с эфферентными потоками информации из этой структуры. Кроме того, эти результаты практически не обсуждаются в аспекте возможных влияний на нижележащие структуры мозга или, например, на BNST; 3) английское сочетание слов neuronal activation автор «транслирует» как нейрональная активация, тогда как в соответствии с нормами грамотного перевода следует говорить «нейронная» активация (отметим, что этот недостаток обнаруживается, к сожалению, почти во всех русских публикациях на эти темы); 4) автор вскользь упоминает о недавней работе (в которой он является соавтором), показавшей, что значимая доля новых клеток в зубчатой фации (где нейрогенез был активирован патологической агрессивностью) маркируются как нейроны. Эти данные важны по существу, но в работе, к сожалению, не обсуждаются.

Ни в обсуждении отдельных серий опытов, ни в общем обсуждении автор не касается возможных причин того, что обнаруженные им чрезвычайно интересные изменения в поведении и в неврологических показателях мышей были выявлены только у части животных. Попытки проанализировать этот феномен были бы очень уместны.

Отметим, что полученные в работе экспериментальные данные обработаны статистически с использованием адекватных методов, и достоверность обнаруженных различий между группами не вызывает сомнений.

Недостатки и замечания по диссертации Д.А. Смагина приведены выше. В работе имеется также значимое число опечаток и ошибок и неудачных выражений. Следует отметить не всегда удачный по форме стиль изложения. Фразы в ряде мест обзора и обсуждения тяжеловесны, нередки повторы, в частности в виде пересказа содержания рисунков и т.д.

В то же время диссертация Д.А. Смагина – это четко спланированное и законченное исследование, полученные в ней новые результаты и основанные на них выводы важны, обоснованы и сопоставлены с существующими данными по этой проблеме.

Используя разнообразные экспериментальные подходы, автор четко показал, что повторный опыт агрессивных конфронтаций у самцов мышей (в соответствии с существующей оригинальной методикой) является патологическим состоянием, которое оказывает влияние и на поведение мышей в других тестах, и вызывает неврологические изменения. Это позволяет говорить о том, что автором получены очень весомые доказательства пригодности данной модели патологического поведения для оценки биологических основ агрессии человека и, в частности, для оценки эффективности

разрабатываемых фармакологических препаратов. Это, в свою очередь, свидетельствует о важной теоретической и практической значимости проведенного исследования.

Автор четко определяет место результатов своей работы в современных представлениях о механизмах агрессивного поведения грызунов. Отмеченные в отзыве недостатки работы не влияют на ее общую высокую положительную оценку. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Тщательный анализ диссертационной работы Д.А. Смагина на тему: «Повторный опыт агрессии и последствия ее депривации у самцов мышей: исследование поведенческих и нейробиологических изменений» позволяет заключить, что она соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в том числе критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» от 24.09.2013 № 842, а автор, Д.А. Смагин, 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, 10.05.2016, протокол № 4.

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



Латанов А.В.

