

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Крупиной Наталии Александровны
на диссертацию Сусоровой Марии Андреевны «Влияние NO на активность
серотонинергической системы медиальной префронтальной коры при формировании и
генерализации условнорефлекторной реакции страха», представленную на соискание
ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационное исследование М.А. Сусоровой выполнено в рамках фундаментальной проблемы изучения структурных нейрофизиологических и нейрохимических механизмов выработки и генерализации реакции страха. Генерализация отрицательных эмоций, в первую очередь, памяти о страхе, способствует распознаванию угроз и потенциально опасных ситуаций, являясь по сути адаптивным процессом, необходимым для выживания, однако чрезмерная генерализация страха, включая контекстный страх, характерна для целого ряда тревожных расстройств, таких как специфические фобии, обсессивно-компульсивное расстройство, паническое расстройство, генерализованное тревожное расстройство и, конечно, посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР). Эффект является трансдиагностическим. Нарушения в обработке сигналов безопасности, которые отмечены при таких расстройствах, влияют на функционирование в социуме и значительно снижают качество жизни. Выяснение центральных механизмов генерализации страха необходимо для поиска новых путей терапии её чрезмерной генерализации.

Несмотря на то, что изучению механизмов формирования и генерализации страха посвящено немало исследований, до сих пор многое остается неясным. В нейрофизиологических исследованиях выявлены структуры, опосредующие процессы формирования страха и генерализацию реакций. Особую роль играет медиальная префронтальная кора (mPFC), которая контролирует формирование условного страха, участвует в регуляции его выраженности и кодировании специфики контекста, обеспечивая взаимосвязь структур мозга в этих процессах. Накапливаются данные о роли отдельных нейротрансмиттерных систем в mPFC, обеспечивающих функционирование внутримозговой системы страха, в первую очередь, серотонинергической системы и нитергической системы, есть свидетельства о влиянии нитергической системы на активность серотонинергической системы в ряде структур мозга, однако в отношении mPFC таких данных недостаточно. В диссертационной работе М.А. Сусоровой была поставлена цель восполнить пробел в наших знаниях о нейробиологических механизмах страха и его

генерализации путем изучения участия локальных нитергических сигналов в регуляции активности серотониновой системы в mPFC по оценкам уровня внеклеточного серотонина, а также проверить, существует ли локальное взаимодействие оксида азота (NO) и серотонина, опосредующее реализацию функций mPFC, связанных с формированием и генерализацией условной реакции страха. Работа М.А. Сусоровой развивает оригинальное направление исследований группы нейрохимии высшей нервной деятельности Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и, по совокупности сказанного, несомненно, является актуальной.

Научная новизна

В диссертационной работе М.А. Сусоровой получены приоритетные данные о влиянии NO на активность серотонинергической системы, состояние которой оценивали по выбросу серотонина в mPFC в норме и при формировании условнорефлекторной реакции страха и генерализации страха.

В комплексном исследовании впервые показано, что в mPFC эндогенный NO оказывает тонические активационные влияния на базальную и вызванную выработкой условнорефлекторной реакции страха активность серотониновой системы. Это заключение сделано на основании результатов, полученных с применением неселективного и селективного ингибиторов NO-синтазы, субстрата и донора NO.

Приведены экспериментальные свидетельства того, что под влиянием субстрата NO-синтаз аргинина уровень внеклеточного серотонина в mPFC увеличивается, а под влиянием неселективного ингибитора NO-синтазы NA, напротив, снижается. Получены интересные данные о том, что направленность и выраженность эффектов экзогенной нитергической стимуляции с использованием донора NO DEA зависят от дозы и длительности введения.

В случае физиологической нагрузки в виде выработки условнорефлекторной реакции страха действие неселективного ингибитора NO-синтазы NA или селективного ингибитора нейрональной NO-синтазы NPLA в mPFC приводит к снижению базального уровня внеклеточного серотонина и, соответственно, уменьшению его функционального подъёма, который происходит при выработке реакции страха, а в день выработки генерализация страха усиливается. В контексте поиска возможных путей купирования генерализации реакции страха вызывает особый интерес установленный диссертантом факт селективного уменьшения проявлений генерализации на безопасный стимул через сутки после выработки реакции страха на фоне действия ингибиторов NO. Данные прямо свидетельствуют об участии нитергической системы медиальной префронтальной коры в снижении генерализации страха, индуцированной формированием этой реакции. Диссертант высказывает предположение о том, что действие ингибиторов NO-синтаз в mPFC во время

выработки условнорефлекторного страха ускоряет угасание генерализованного страха, что может быть связано с нарушением процессов консолидации памяти о генерализованном страхе под влиянием этих ингибиторов. Отсюда следует, что сниженный уровень серотониновой активации в mPFC на этапе формирования условнорефлекторной реакции страха может быть одним из условий ослабления генерализации этой реакции через сутки.

Интересно, что длительная экзогенная стимуляция mPFC путем введения донора NO DEA снижает функциональную активацию серотониновой системы в процессе выработки условнорефлекторной реакции страха и может уменьшать ее последующую генерализацию.

Научно-практическая значимость

Данные, полученные в диссертационном исследовании М.А. Сусоровой, расширяют существующие в нейрофизиологии представления о роли медиальной префронтальной коры мозга в функционировании внутримозговой системы страха и открывают новые пути для нейрохимического анализа регуляции страха, его генерализации в норме и чрезмерной генерализации при патологических состояниях на основе знаний о взаимодействии нитергической и серотонинергической систем в данной структуре.

С практической точки зрения особое значение приобретает показанное в работе более быстрое угасание проявлений генерализации страха в случае действия ингибиторов NO-синтаз, в первую очередь, нейрональной NO-синтазы, в медиальной префронтальной коре при выработке условнорефлекторной реакции страха. Эти результаты следует учитывать при разработке подходов к терапии тех заболеваний, которые сопровождаются развитием патологически усиленного генерализованного страха.

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

Получение достоверных результатов в данном диссертационном исследовании обеспечено использованием адекватной международно признанной экспериментальной модели условнорефлекторного страха, хорошо продуманными четкими схемами исследования на каждом из этапов работы, выбором линии крыс, по своим поведенческим характеристикам удобной для проведения длительных микродиализных экспериментов *in vivo*, достаточным числом животных в каждой из экспериментальных групп крыс и соблюдением этических требований при работе с животными, а также применением современных методов статистической обработки данных, соответствующих поставленным задачам. Полученные результаты надежны, научные положения, выносимые на защиту, обоснованы.

Общая характеристика диссертации, её завершенность

Диссертация построена по традиционному плану и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты с обсуждением по главам, заключение и выводы, подробный список сокращений и список литературы. Работа изложена на 111 страницах, включая список литературы, содержит 28 рисунков, 2 таблицы и 1 схему эксперимента. Список литературы содержит 379 источников, из них 12 работ, опубликованных в отечественных журналах.

Во введении четко обоснована актуальность изучения влияния нитрергической системы на активность серотонинергической системы в mPFC для понимания механизмов формирования страха и его генерализации, сформулирована цель работы и поставлены задачи, которые были полностью решены, представлены необходимые разделы с описанием научной новизны, теоретической и практической значимости работы, сформулированы 2 основных положения, выносимых на защиту, перечислены научные мероприятия, на которых были представлены основные результаты исследования, отмечен личный вклад автора.

Обзор литературы занимает 38 страниц, его содержание соответствует вопросам, поставленным в диссертационном исследовании. В обзоре диссертант выделил три основных блока, в первом из которых дана морфофункциональная характеристика медиальной префронтальной коры с акцентом на участии нитрергической системы в работе этой структуры, во втором блоке приведены современные представления о серотонинергической системе с акцентом на ее роли в патогенезе психических расстройств, и, в завершение обзора, в третьем блоке рассмотрены и проанализированы факты взаимодействия нитрергической и серотонинергической нейромодуляторных систем мозга. Обзор написан хорошим научным языком, полноценно иллюстрирован (включает 5 рисунков), построен в соответствии с внутренней логикой, читается легко и может быть рекомендован для публикации частями в научных изданиях. Качество обзора литературы свидетельствует о фундаментальной подготовке диссертанта в выбранной области.

В главе «Материалы и методы» дано детальное описание всех использованных методов: ключевого для данной работы метода прижизненного внутримозгового микродиализа в целом, процесса имплантации микродиализных канюль в mPFC, отбора микродиализных проб, выработки условнорефлекторной реакции страха, оценки ее выраженности и генерализации на разных этапах эксперимента по показателю замирания, оценки двигательной активности и уровня тревожности, а также проведения морфологического контроля. Нельзя не отметить ясную схему основного эксперимента и подробные таблицы, поясняющие дизайн исследования для всех групп крыс, которых

использовали в экспериментах по изучению влияния активации и блокады NO-системы на уровень внеклеточного серотонина в mPFC без выработки условнорефлекторной реакции страха и во время её выработки с последующей оценкой уровня генерализации страха и реализации самой реакции. Статистическая обработка выполнена с использованием современных требований к анализу данных. Методический уровень работы позволяют говорить о хорошей научно-квалификационной подготовке диссертанта.

Глава «Результаты» состоит из двух больших подразделов с обсуждением результатов в каждом. В первый подраздел диссертант включил результаты изучения влияния активации и блокады нитрергической системы mPFC на уровень серотонина в структуре. Полученные данные проиллюстрированы 6 рисунками. Надо отметить, что все рисунки, на которых представлены результаты диссертационного исследования, отличаются высоким качеством. В этой главе продемонстрирована зависимость эффектов от доз субстрата NO L-аргинина и донора NO DEA. При последовательном увеличении концентрации DEA обнаружено, что высокие дозы снижают уровень внеклеточного серотонина. Установлен интересный факт снижения, повышенного при действии флуоксетина уровня серотонина под влиянием неселективного ингибитора NO-синтазы. По итогам исследований, результаты которых приведены в этом подразделе, убедительно показано активирующее действие NO на серотониновую передачу. Выявлена важная закономерность, заключающаяся в том, что эндогенная и экзогенная стимуляция нитрергической системы mPFC по-разному влияют на динамику высвобождения серотонина: более стабильную и длительную активацию вызывает эндогенная стимуляция, а эффект экзогенной стимуляции зависит от концентрации вводимого донора NO и продолжительности его действия.

Во втором подразделе приведены результаты исследования влияния блокады и активации нитрергической системы mPFC на уровень внеклеточного серотонина в данной структуре в ходе выработки условнорефлекторной реакции страха, дифференцировки (оценка генерализации) в первый и второй дни эксперимента и реализации реакции страха. Результаты представлены на 15 рисунках. К числу основных находок в этом подразделе относятся следующие факты. В отсутствие ингибиторов NO показано увеличение уровня внеклеточного серотонина в mPFC относительно фона в процессе выработки реакции страха и на этапе дифференцировки опасного и безопасного сигналов. Последствия действия селективного и неселективного ингибиторов NO-синтазы – NPLA и NA – в mPFC оказались схожи по динамике уровня внеклеточного серотонина в mPFC: снижение базального уровня внеклеточного серотонина и уменьшение подъема этого уровня как при выработке условнорефлекторной реакции страха, так и при дифференцировке сигналов в день выработки. Важно, что выраженность замирания крыс при действии разных ингибиторов NO

на разных этапах эксперимента также была схожа: при предъявлении опасного сигнала отсутствие отличий от контроля на этапах выработки и реализации, при предъявлении безопасного сигнала увеличение замирания в день выработки и снижение замирания через сутки. Таким образом, на фоне действия обоих ингибиторов спустя сутки после выработки отмечено уменьшение генерализации страха, которое диссертант связывает с вызванным ингибиторами NO снижением выброса серотонина в mPFC во время выработки условнорефлекторной реакции страха. Эта находка открывает принципиальную возможность рассматривать ингибиторы NO в качестве кандидатов для разработки патогенетической терапии чрезмерного усиления страха. Сходство действия неселективного ингибитора NO и селективного ингибитора нейрональной NO-синтазы позволило диссертанту предположить, что основные обнаруженные эффекты изученных NO-ингибиторов связаны с их влиянием на активность нейрональной NO-синтазы.

В этих экспериментах диссертант контролировал двигательную активность в первый день введения препаратов и уровень тревожности крыс во второй день. Поскольку различий между группами по этим показателям не было выявлено и пороги чувствительности к электрокожному раздражению также не различались, диссертант сделал обоснованный вывод о том, что изменения в выраженности замирания не могут быть обусловлены изменениями поведения. В этих экспериментах был обнаружен еще один любопытный факт увеличения числа стоек в процессе выработки реакции страха у крыс, которым вводили ингибиторы NA и NPLA в mPFC. Объяснение этому наблюдению еще предстоит получить.

Одной из интересных находок в диссертационном исследовании М.А. Сусоровой является обнаружение двухфазного действия донора NO на динамику уровня серотонина в mPFC при выработке реакции страха: кратковременное повышение уровня в начале действия препарата с последующим постепенным снижением. Обсуждая данные подраздела, М.А. Сусорова рассмотрела молекулярные механизмы, которые могут опосредовать изменения уровня серотонина в mPFC при активационных и тормозных воздействиях на нитергическую систему при выработке условнорефлекторной реакции страха и ее генерализации. Хороший уровень обсуждения свидетельствует о способности диссертанта к критическому анализу данных.

В Заключение в лаконичной форме представлена суть проделанной работы и полученных результатов.

Выводы соответствуют поставленным задачам, основаны на полученных результатах и корректно сформулированы.

Автореферат полно отражает содержание диссертационного исследования, включает положения, выносимые на защиту, оформлен в соответствии с существующими требованиями.

Результаты исследования отражены в 3 статьях, опубликованных в отечественных журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук (биологические науки), в Белый список, ядро РИНЦ, базу данных RSCI, 1 статья в журнале, индексируемом в РИНЦ. Результаты диссертационного исследования широко представлены на профильных научных конференциях, что нашло отражение в 16 опубликованных тезисах.

Замечания и вопросы по диссертации

Принципиальных возражений и замечаний по диссертационному исследованию нет.

При ознакомлении с работой возникли некоторые вопросы, в том числе, дискуссионного характера:

1) В методическом разделе в п. 2.6. «Морфологический контроль» на рис. 3, иллюстрирующем схематическое изображение локализации диализных канюль в mPFC, представлены срезы мозга крыс, соответствующие не только тем координатам, которые указаны в п. 2.3. Учитывали ли различие в локализации канюль, выявленное по результатам морфологического контроля, при анализе результатов блокады и усиления нитергической передачи?

2) Микродиализные эксперименты и тестирование поведения начинали уже на второй день после оперативного вмешательства по имплантации канюли. Есть ли данные о том, что спустя сутки после применения использованного в работе общего наркоза поведение крыс полностью нормализуется?

3) На основании каких данных выбирали дозы ингибиторов NO-синтаз, субстрата NO-синтазы и донора NO?

4) Диализную канюлю в процессе исследования имплантировали унилатерально в правую mPFC. С чем связан выбор правого полушария для имплантации канюли? Что известно о наличии или отсутствии асимметрии серотонинергической и нитергической систем в мозге грызунов?

5) В доклинических исследованиях при моделировании тревожности ингибиторы нейрональной и индуцибельной NO-синтаз в условиях системного и центрального введения проявляют анксиолитическое действие, а при моделировании ПТСР подавляют побочные анксиогенные эффекты флуоксетина. В клинических исследованиях показано, что различные

окислительные биомаркеры, включая нитриты, обнаружены в высоких концентрациях у пациентов, страдающих социальной фобией, ПТСР или паническим расстройством. Что известно на сегодняшний день о возможности применения ингибиторов NO-синтаз в клинике при психоневрологических расстройствах, ассоциированных с тревожностью? Какие сложности и какие перспективы просматриваются?

Сделанные замечания и встречающиеся в тексте отдельные неточности не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Сусоровой Марии Андреевны «Влияние NO на активность серотонинергической системы медиальной префронтальной коры при формировании и генерализации условнорефлекторной реакции страха» является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи изучения взаимодействия активности нитроергической и серотонинергической систем в медиальной префронтальной коре при формировании и генерализации условнорефлекторной реакции страха, что имеет значение для физиологии человека и животных. По актуальности темы, объему выполненных автором исследований, новизне полученных данных и научно-практической значимости результатов диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных.

Доктор биологических наук,
главный научный сотрудник лаборатории общей патологии нервной системы
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Крупина Наталия Александровна

«29» сентября 2025 г.

Контактные данные: Тел.: +7(917)550-21-55 e-mail: krupina-na@yandex.ru

Адрес места работы: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Тел. рабочий: +7 499 151-1756

e-mail рабочий: niiopp@mail.ru

Подпись д.б.н. Н.А. Крупиной заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

кандидат медицинских наук

«29» сентября 2025 г.



Кожевникова Елена Николаевна