

УТВЕРЖДАЮ



Директор  
Федерального Бюджетного Учреждения Науки  
Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН  
член-корр. РАН Д.П. Дворецкий  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу НИКИТИНА Евгения Сергеевича по теме:  
«Пространственная организация нервной клетки как основа клеточных и сетевых механизмов пластичности», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01. – «физиология»

#### Актуальность работы.

Цель работы сформулирована Е.С.Никитиным как «исследование нейронных механизмов поведения и пластических перестроек при обучении с использованием оптической регистрации электрической активности нейронов на разных уровнях. Для каждого уровня организации нейронной сети, начиная от субнейронных компартментов и заканчивая сложными осциллирующими сетями, требовалось разработать специальный оптофизиологический подход с привлечением дополнительных поведенческих, иммуноцитохимических, цитологических и других методик экспериментальной нейробиологии». Т.е., основной акцент работы автор ставит на разработке методики оптической регистрации электрической активности нейронов применительно к фундаментальной проблеме нейронных механизмов поведения. Можно утверждать, что и фундаментальная проблема нейронных механизмов поведения и методическая задача по разработке методики оптической регистрации электрической активности нейронов, применительно к исследованию указанной фундаментальной проблемы, являются актуальными.

#### Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, четырех глав (занимают, соответственно, 84 стр, 34 стр, 45 стр. и 12 стр.) с изложением результатов и их обсуждением, заключения, выводов и списка литературы (341 ссылка). Работа содержит 1 таблицу и 66 рисунков. Объем рукописи – 284 стр.

### **Обзор литературы.**

Включает 3 части: 1) Простая нервная система гастропод как основная модель исследований клеточных основ поведения и памяти, 2) Субклеточная локализация сайтов пластичности в нейронах беспозвоночных и позвоночных животных. 3) Современная оптическая регистрация функциональной электрической активности нейронов ЦНС. Обзор содержит анализ современных публикаций по указанным темам и может быть использован в ВУЗах в лекционных курсах по нейробиологии обучения.

### **Методические подходы.**

Работа выполнена на нескольких объектах (виноградные улитки *Helix lucorum* L., пресноводные улитки *Lymnaea stagnalis*, морские ангелы *Cione limacine*, крысы линии Wistar) с применением комплекса современных методик. В работе использовали препараты изолированной ЦНС или ЦНС с нервами и периферическими обонятельными структурами, губами, ретракторами щупальца или частью кожи, а также срезы зрительной коры крыс линии Wistar.

Регистрировали 1) внеклеточные и внутриклеточные потенциалы нейронов, а также 2) трансмембранные токи, используя электрофизиологические методики двухэлектродной фиксации потенциала и patch-clamp. Оптическую регистрацию потенциалов нейронов и свободного кальция в клетке проводили с применением потенциал-зависимых красителей. Также использовали иммуоцитохимические и поведенческие методики. Проводили видеорегистрацию движений щупальца. Таким образом, очень целенаправленно использовано сочетание многообразных современных методов, каждый из которых детально описан.

### **Новизна полученных результатов.**

1) Первая экспериментальная глава занимает в диссертации, практически, тот же объем, что и остальные 3 экспериментальные главы вместе взятые. Она содержит самые важные, приоритетные результаты диссертации. В этой главе впервые детально описаны клеточные механизмы, с помощью которых вызванные обучением несинаптические электрические изменения в нейрональной коме, расположенной далеко от синаптических областей, переходят в эффекты, проявляющиеся на уровне нейронных сетей и синапсов.

Используя культуру клеток прудовика на паре моносинаптически связанных нейронов изящно показано, что деполяризация мембраны пресинаптического нейрона приводит к увеличенным постсинаптическим ответам и повышению уровня пресинаптического кальция.

Показано, что увеличение постоянного электроуправляемого натриевого тока в ключевом для поведения модуляторном нейроне стоит за отставленной постоянной деполяризацией, появляющейся в этом нейроне после выработки классического условного рефлекса. Дальнейший анализ показал, что связующим звеном между несинаптическими изменениями в нейроне и компартиментализованными изменениями в синаптической эффективности служит локальная потенциал-зависимая инактивация калиевого тока А-типа.

Это - результаты мирового уровня. Их следует оценить как самое значительное достижение Е.С.Никитина, которое вносит существенное дополнение в выявленные клеточные механизмы обучения.

2) Во второй главе РЕЗУЛЬТАТОВ показано, что в обонятельной системе виноградной улитки взаимодействие осцилляторной активности и активности отдельного нейрона играет важную роль в тонкой настройке ориентационного поведения к изменяющимся условиям окружающей среды. По данным автора, тормозная связь между обонятельным мозгом и мотонейроном ретрактора щупальца может служить субстратом для модификаций нейронных связей, лежащих в основе аверсивного обучения на запахах.

Это исследование интересно само по себе, но представление его в данной диссертации избыточно, тем более, что оно нашло отражение в кандидатской диссертацией Е.С.Никитина "Роль процеребрума моллюска *Helix* в восприятии запахов и формировании поведения" (2003 г.)

3) В третьей главе РЕЗУЛЬТАТОВ проведенный анализ ответов нейронов серотонинергической группы оптически и электрофизиологическими методами определил функционирование всей группы как единой сети модуляции оборонительного поведения с одним гигантским «выходным» нейроном, которому другие нейроны делегируют «функцию общения» с остальной нервной системой.

Этот пункт интересен, но не является новым. Он сформулирован в докторской диссертации (защищенной в 2009 году) сотрудника той же лаборатории ИЕРУСАЛИМСКОГО Виктора Николаевича, **«Функциональная регуляция и онтогенез медиатор-специфичных систем нейронов беспозвоночных»**. В разделе новизна диссертации ИЕРУСАЛИМСКОГО В.Н. в пункте 2 указано: «Впервые показано, что влияние целой группы модуляторных серотонинергических нейронов на командные нейроны оборонительного поведения осуществляется через посредство одного нейрона (Пд4).».

#### Положения выносимые на защиту. Их 2:

1) Компарментализация строения нейрона и функциональная специализация его отростков и синапсов являются основой для эффективного хранения и воспроизведения следов долговременной ассоциативной памяти.

2). Несинаптическая долговременная пластичность может реализовываться в изменении эффективности выходных синапсов нейрона путем изменения параметров генерации потенциала действия, что является одним из существенных механизмов хранения следов памяти на уровне отдельного нейрона.

Второе положение вносит существенный вклад в нейробиологию обучения. Первое положение также важно. Но формулировка неудачная, поскольку не раскрывает содержания, и нуждается в разъяснении. «Компарментализация строения нейрона и функциональная специализация его отростков и синапсов являются основой для...? Она вызывает вопрос: Почему?»

#### Публикации по теме диссертации.

Опубликовано 15 статей в рецензируемых журналах. При этом 8 статей опубликованы в высокорейтинговых международных журналах, некоторые из которых входят в Top-100: Current Biology (IF=9.916), Neurobiol. Learn. Mem. (IF=4.035), Eur. J. Neurosci. (IF=3.669), J. Neurophysiology (IF=3.3).

#### **Наукометрические показатели Е.С.Никитина.**

По данным Web of Science число публикаций = 35, индекс цитирования = 195, а индекс Хирша = 7. Эти показатели свидетельствуют об интересе научного сообщества к результатам диссертации.

#### **Научно-практическая значимость работы.**

В теоретическом плане полученные в диссертации результаты дополняют современные представления о клеточных и сетевых механизмах пластичности нервной системы, лежащих в основе обучения. В практическом плане результаты диссертации могут найти применение при конструировании технических обучающихся систем.

#### **Замечания.**

1) Название диссертации, видимо, не самое оптимальное. Оно не отражено в цели исследования и в конкретных задачах. В тексте диссертации дана следующая формулировка цели диссертации: «Исследование нейронных механизмов поведения и пластических перестроек при обучении с использованием оптической регистрации электрической активности нейронов на разных уровнях». Тогда, именно эту тему логично было вынести в качестве названия, поскольку автор не сформулировал конкретную цель, которая объединяла бы 4 блока интересных исследований в рамках 4х независимых одна от другой задач.

2) Формулировка первого положения, вынесенного на защиту, могла быть более детальной, поскольку в представленной форме положение требует разъяснений для понимания его конкретного содержания.

3) В главе МЕТОДИКА принято выделять специальный раздел, посвященный статистическому анализу. К сожалению, автор не перечислил использованные статистические методы и статистические программы.

4) Можно отметить многочисленные стилистические недочеты в тексте, связанные с употреблением англоязычного термина вместо существующего перевода на русский язык: «релиз медиаторов» «ресайклинг синаптических везикул» (стр.54), «кальциевый имаджинг» (стр. 81), «аттенюация кальциевого сигнала»(стр. 122), «стимуляция трейном»; (стр. 162).

К содержанию работы претензий нет. Сделанные замечания являются дискуссионными.

**Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.** Результаты и выводы диссертации Никитина Е.С. могут быть использованы в научно-исследовательской работе

Института биологии развития РАН, Института физиологии им. И.П.Павлова РАН, Института нормальной физиологии им. П.К.Анохина РАМН, Научного Центра неврологии РАМН, на биологическом и психологическом факультетах Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, биологических факультетах Санкт-Петербургского и Приволжского государственных университетов.

**Научные коллективы, которым следует продолжить или развить научное направление диссертации.** Это исследовательские коллективы в Институте биологии развития РАН (рук. И.С.Захаров), Институте физиологии им. И.П.Павлова РАН (рук. Л.Н.Гринкевич), Приволжском университете (рук. Х.Л.Гайнутдинов), Институте нормальной физиологии им. П.К.Анохина РАМН (рук. В.П.Никитин).

#### **Заключение.**

Представленная диссертация Е.С.Никитина производит сильное впечатление. Ее можно оценить как научно-квалификационную работу, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны важные теоретические положения о механизмах пластичности отдельных нейронов и нейронных сетей, лежащих в основе обучения. Совокупность сделанных в диссертации теоретических положений можно квалифицировать как значительное научное достижение.

Работа соответствует критериям ВАКа для докторских диссертаций (Положение об ученых степенях 2013 года, пункт II.9), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности «физиология» (03.03.01).

Отзыв рассмотрен и утвержден на совместном заседании лаборатории нейрогенетики и лаборатории сравнительной генетики поведения ФГБУН Института физиологии им. И.П.Павлова РАН 22 января 2015 г. (протокол № 1).

#### **ПРИЛОЖЕНИЕ 1.**

##### **Сведения о ведущей организации:**

1. Полное наименование: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук
2. Сокращенное наименование: ОФК 02, ИФ РАН
3. Почтовый адрес: 199034, г. Санкт -Петербург, наб. Макарова, д.6.
4. Юридический адрес: 199034, г. Санкт -Петербург, наб. Макарова, д.6.
5. Телефон (812) 328-07-01, Email: tch@infran.ru

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

### Публикации Никитина Е.С. по теме диссертации.


1. Асеев Н. А., **Никитин Е. С.**, Рощин М. В., Иерусалимский В. Н., Балабан П. М. (2012) Биолистическая доставка потенциалзависимых красителей в клетки срезов живого мозга млекопитающих для оптической регистрации нейронной активности. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова. 62(1):100-7
2. Асеев Н.А., Ушаков В.Л., **Никитин Е.С.**, Рощин М.В., Иерусалимский В.Н., Балабан П.М. (2012) Разработка метода биолистической доставки потенциалзависимых красителей в клетки срезов живого мозга млекопитающих для оптической регистрации нейронной активности. Ядерная физика и инжиниринг. - Москва: МАИК "Наука/Интерпериодика", 2011. - стр. 472-478
3. **Никитин Е. С.**, Н. А. Асеев, П. М. Балабан. (2013) Усовершенствованная оптическая регистрация нейрональной активности с использованием потенциал-зависимых красителей. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова. 6 (63): 656-66.
4. **Никитин Е.С.**, Балабан П.М. (1999) Оптическая регистрация событий вызванных запахом в высших обонятельных структурах наземного моллюска Helix. Журн. Высш. Нерв. Деят. Т. 49(5): 817-29. Переведено на английский: Neurosci Behav Physiol. 2001 Jan-Feb;31(1):21-30.
5. **Никитин Е.С.** Балабан П.М. (2011) Структурно-функциональная организация сети серотонинэргических нейронов наземной улитки. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова. 2011, 61(6): 750-762.
6. Норемян Т.П., **Никитин Е.С.**, Браваренко Н.И., Малышев А.Ю., Балабан П.М. (2001) Фазозависимая координация двух моторных программ в буккальном ганглии клылоногого моллюска. Журн. Высш. Нерв. Деят. Т. 51(6):717-22. Переведено на английский: Neurosci Behav Physiol. 2003 Feb; 33 (2):107-11.
7. Aseyev N, Roshchin M, Ierusalimsky VN, Balaban PM, **Nikitin ES**. (2013) Biolistic delivery of voltage-sensitive dyes for fast recording of membrane potential changes in individual neurons in rat brain slices. J Neurosci Methods. Sep 13;212(1):17-27.
8. Balaban PM, Bravarenko NI, Maksimova OA, **Nikitin E**, Ierusalimsky VN, Zakharov IS (2001) A single serotonergic modulatory cell can mediate reinforcement in the withdrawal network of the terrestrial snail. Neurobiol Learn Mem. 2001 Jan; 75(1):30-50.
9. **Никитин Е.С.**, Захаров И.С. Балабан П.М. (2004) Регуляция длины щупальца в зависимости от концентрации запаха. Журн. Высш. Нерв. Деят. Т. 54(5):655-65. Переведено на английский: Neurosci Behav Physiol. 2006 Jan;36(1):63-72.
10. **Nikitin ES**, Balaban PM (2000) Optical recording of odor-evoked responses in the olfactory brain of the naïve and aversively trained terrestrial snails. Learn Mem. 2000 Nov-Dec; 7(6):422-32.

11. **Nikitin ES, Zakharov IS, Samarova EI, Kemenes G, Balaban PM.** (2005) Fine Tuning of Olfactory Orientation Behaviour by the Interaction of Oscillatory and Single Neuronal Activity. *Eur J Neurosci.* 2005 Dec;22(11):2833-44.
12. **Nikitin ES, Kiss T, Staras K, O'Shea M, Benjamin PR, Kemenes G** (2006) A persistent sodium current is a target for cAMP-induced neuronal plasticity in a state-setting modulatory interneuron. *J Neurophysiol.* 2006 Jan;95(1):453-63. Epub 2005 Sep 14.
13. **Kemenes I, Straub VA, Nikitin ES, Staras K, O'Shea M, Kemenes G, Benjamin PR** (2006) Role of delayed nonsynaptic neuronal plasticity in long-term associative memory. *Curr Biol* 2006 Jul; 16:1269-79.
14. **Nikitin ES, Korshunova TA, Zakharov IS, Balaban PM** (2008) Olfactory experience modifies the effect of odour on feeding behaviour in a goal-related manner. *J Comp Physiol A.* Jan;194(1):19-26.
15. **Nikitin, ES, Balaban, PM, Kemenes. G** (2013) Nonsynaptic plasticity underlies a compartmentalized increase in synaptic efficacy after classical conditioning. *Curr Biol.* 23 (7): 614-619.

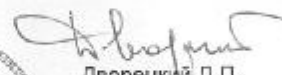
Зав. лабораторией нейрогенетики  
 Ведущий научный сотрудник  
 ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН  
 доктор биологических наук

  
 Савватеева-Полова Е.В.

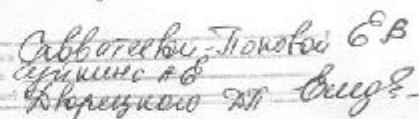
Ученый секретарь  
 ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН  
 кандидат биологических наук

  
 Чуйкин А.Е.

Директор  
 ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН  
 Член-корр. РАН, профессор

  
 Дворецкий Д.П.



  
 Савватеева-Полова Е.В.  
 Савватеева-Полова Е.В.  
 Дворецкого Д.П.