

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора психологических наук, профессора, заведующего кафедрой психофизиологии факультета психологии ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова» - Черноризова Александра Михайловича - о диссертации Никитина Евгения Сергеевича «Пространственная организация нервной клетки как основа клеточных и сетевых механизмов пластичности», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – Физиология (биологические науки)

Диссертация Е.С. Никитина посвящена одной из самых **актуальных** тем нейробиологии – изучению клеточных и нейросетевых механизмов пластичности. При этом в фокусе внимания – вот уже более ста лет – находятся межнейронные «синаптические контакты», которые рассматриваются как основные мишени пластических перестроек в механизмах памяти и обучения и как базовые элементы системной организации мозга. Состояние исследований синапсов в нейронауках можно, без сильного преувеличения, диагностировать как своеобразную «синаптоманию». Современная синаптология представлена международным периодическим изданием “Synapse”, десятками монографий, посвященных структуре и функциям синапсов в норме и патологии (например, болезни Альцгеймера). Это объясняется высокой **значимостью** синаптологии не только для нейронаук и исследований в области *искусственного интеллекта* (искусственных нейросетей), но и для изучения *механизмов высших психических функций человека* (восприятия, памяти и обучения, мышления и сознания). Показательной в плане иллюстрации междисциплинарного интереса к проблеме синапсов является недавно вышедшая фундаментальная монография Нобелевского лауреата Э. Канделя «В поисках памяти: Возникновение новой науки о человеческой психике» (2012).

Оригинальность и **новизна** подхода Е.С. Никитина к изучению клеточных и нейросетевых механизмов пластичности определяются:

1) оригинальностью и новизной *постановки задачи* по изучению вклада *внесинаптических факторов* («пространственной организации нервной

клетки») в клеточную и нейросетевую (синаптическую) пластичность, как основу пластичности поведения;

2) комплексной междисциплинарной организацией исследований на биохимическом, электрофизиологическом и поведенческом уровнях с использованием самых современных экспериментальных методик (двухэлектродная фиксация потенциала и 'patch-clamp'; регистрация свободного кальция в клетке с помощью кальций-чувствительных зондов; методы конфокальной, эпифлуоресцентной и дифракционно-интерференционной микроскопии в сочетании с иммуноцитохимическим и прижизненным окрашиванием; опыты на срезах мозга и изолированных нейронах; классические поведенческие методы с использованием видеорегистрации и телеметрии);

3) использованием и развитием инновационных методов современных нейронаук в области оптической регистрации клеточной активности с помощью потенциал-зависимых красителей.

Удачным является выбор в качестве **объектов исследования беспозвоночных и позвоночных животных**. Моллюски (*Helix lucorum L.*, *Lymnaea stagnalis*, *Clione limacine*) входят в список «классических» объектов для изучения клеточных механизмов пластичности. Крысы (линии *Wistar*) являются наиболее популярным лабораторным животным для изучения механизмов пластичности поведения позвоночных. Такая комбинация животных моделей позволила автору корректно обосновать возможность использовать данные, полученные на беспозвоночных, для обсуждения механизмов пластичности у позвоночных.

Текст диссертации включает **введение; формулировки положений, выносимых на защиту; обзор литературы, описание методов исследования, четыре раздела с описанием и обсуждением результатов, общее заключение, общие выводы, список сокращений и список литературы** (341 ссылка, из которых 336 – на иностранные первоисточники). Работа изложена на 284 страницах и содержит 66 рисунков и 1 таблицу.

В **Обзоре литературы** представлен анализ широкого спектра проблем, касающихся темы исследования. В *первой части* обзора тщательно обоснован выбор «простой нервной системы» гастропод в качестве основной модели исследований клеточных основ поведения и памяти. Во *второй части* подробно описаны современные данные, касающиеся субклеточной локализации сайтов пластичности в нейронах беспозвоночных и позвоночных животных. И, наконец, в *третьей части* обзора особое внимание уделено анализу современных технологий оптической регистрации функциональной электрической активности нейронов ЦНС. Ясно и полно изложенный обзор четко соответствует логике экспериментальной части работы и полностью выполняет свою основную функцию – обоснование актуальности, новизны и научно-практической значимости исследования.

В разделе 4, посвященном описанию **методов исследования**:

1) обоснован выбор конкретных *объектов исследования* – беспозвоночных (виноградных улиток *Helix lucorum L.*, пресноводных улиток *Lymnaea stagnalis*; брюхоногих моллюсков *Clione limacine*, морских ангелов, из отряда *Gymnosomata*) и позвоночных (крысы линии *Wistar*) животных;

2) подробно описан широкий спектр использованных в работе *современных экспериментальных методик*: методы двухэлектродной фиксации потенциала и ‘patch-clamp’; методы регистрации свободного кальция в клетке с помощью кальций-чувствительных зондов; методы конфокальной, эпифлуоресцентной и дифракционно-интерференционной микроскопии; методы иммуоцитохимии, и др.);

3) описаны *типы реализованных в исследовании биохимических, электрофизиологических и поведенческих опытов* и содержание решаемых в них задач.

Оценивая тщательно подобранный и в деталях описанный автором методический инструментарий, можно заключить, что он полностью соответствует поставленным задачам и отражает современный уровень методического обеспечения нейробиологических исследований.

Описанию и обсуждению экспериментальных данных посвящены четыре основных раздела диссертации: раздел 5 «Несинаптическая пластичность как основа ассоциативной памяти и увеличения синаптической эффективности», раздел 6 «Взаимодействие осцилляторной нейросетевой активности с отдельным нейроном как субстрат обонятельного обучения», раздел 7 «Анализ функциональных взаимоотношений в сетях интернейронов, участвующих в реализации подкрепления и генерации ритмической активности» и раздел 8 «Перспективы применения методов оптической регистрации для изучения пластичности и памяти на системах позвоночных животных».

Работа содержит *очень большой объем разноплановых экспериментальных данных*, что связано с четко выдерживаемой автором стратегии на логически обоснованное пошаговое решение основных задач исследования. В этой ситуации среди множества интересных полученных автором результатов имеет смысл выделить те, которые обладают наиболее ярко выраженной **научной новизной и значимостью**:

1. Комбинируя методы классического обучения с методами электро- и оптофизиологии, автор **впервые** обнаружил клеточные механизмы, с помощью которых вызванные обучением несинаптические электрические изменения в нейрональной соме (отставленная во времени постоянная деполяризация после обучения животного классическому условному рефлексу) вызывают пластические изменения на уровне нейронных сетей и синапсов. Механизм включает (а) увеличение постоянного тетродотоксин (ТТХ) - устойчивого натриевого тока в ключевом для поведения модуляторном нейроне, $I_{Na(P)}$ (= источник постоянной деполяризации сомы), и (б) локальную потенциал-зависимую инактивацию калиевого тока А-типа (= связующее звено между несинаптическими изменениями в нейроне и компартиментализованными изменениями в синаптической эффективности).

2. В исследованиях взаимодействия простой (моллюски) сенсорной (обонятельной) и моторной систем экспериментально показано, что тормозные влияния ритмической активности обонятельного мозга на реакции

мотонейрона ретрактора щупальца могут существенным образом влиять на модификацию нейронных связей, лежащих в основе аверзивного обучения на запахах. Таким образом, **взаимодействия осцилляторной активности и активности отдельного нейрона** играют важную роль в механизмах обонятельного обучения.

3. Анализ ответов нейронов **серотонинергической группы** с помощью методов электро- и оптофизиологии позволил автору прийти к важному выводу о том, что вся эта группа функционирует **«как единая сеть модуляции оборонительного поведения с одним гигантским «выходным» нейроном**, которому остальные нейроны делегируют функцию общения с остальной нервной системой».

4. Эксперименты, проведенные на переживающих срезах мозга млекопитающего (крыс линии *Wistar*), подтверждают **перспективность использования оптических методов регистрации нейронной активности** для исследований клеточных механизмов пластичности и памяти в **ЦНС млекопитающих**.

5. В совокупности, экспериментальные данные убедительно свидетельствуют в пользу основного вывода автора о существовании **нового, впервые им описанного, механизма клеточной пластичности - несинаптической пластичности**, позволяющей модифицировать «эффективность синаптической передачи на субклеточном уровне путем досинаптической обработки электрических сигналов в специфических нейрональных компартментах».

Результаты диссертационного исследования могут быть эффективно использованы в **научных и практико-ориентированных исследованиях, а также в системе образования:**

1. Теоретически обоснованный и методически разработанный автором комплексный экспериментальный подход позволяет проводить системные исследования механизмов пластичности на нескольких взаимосвязанных уровнях: субклеточном, клеточном, нейросетевом и поведенческом.

2. Описанные автором явления «несинаптической пластичности» могут (и должны) быть учтены в коннекционистских моделях нейросетей, на которых базируются современные разработки искусственных нейросетей и «искусственных ячеек памяти» (мемристоров).

3. Внедрение описанных и усовершенствованных в диссертации методов оптической регистрации позволит разработать новые подходы в нейрохирургии в целях прогноза эффективности и безопасности операций на мозге.

4. Обстоятельный современный литературный обзор может быть использован в ВУЗах в лекционных курсах по клеточной нейрофизиологии и нейробиологии обучения.

Существенных замечаний по работе нет, и имеется лишь несколько вопросов уточняющего характера.

1. Каковы литературные и собственные данные автора по взаимодействию ионных токов, обеспечивающих потенциалы действия гигантской церебральной клетки CGC?

2. Одно из утверждений в работе сформулировано следующим образом: «эффект цАМФ на потенциал-чувствительный $I_{Na(P)}$ длится более ≤ 24 часов, указывая на то, что цАМФ может участвовать не только в кратковременной, но и в долговременной пластичности в нейроне CGC». Здесь возникает вопрос о том, как объяснить (гипотезы, факты) влияние универсального вторичного посредника цАМФ на потенциал-чувствительный $I_{Na(P)}$? Каковы здесь предполагаемые автором причинно-следственные биохимические цепочки?

3. В работе локальная потенциал-зависимая инактивация калиевого тока А-типа рассматривается в качестве связующего звена между несинаптическими изменениями в нейроне и компартментализованными изменениями в синаптической эффективности. Однако при этом констатируется отсутствие расширения заднего фронта спайка. Вопросы: в чем состоит разница между эффектом такой блокады в опытах автора, без «расширения» заднего фронта ПД, и блокадой потенциал-зависимых калиевых

каналов при действии ТЭА, сопровождающейся «расширением» заднего фронта ПД?

4. Чем, интересно, объясняется тетродоксин (ТТХ)-устойчивость натриевых каналов, генерирующих $INa(P)$? Чем они отличаются от потенциал-зависимых тетродоксин-чувствительных натриевых каналов, обеспечивающим передний фронт классического ПД?

5. В настоящей работе было впервые продемонстрировано, что «несинаптические изменения, лежащие в основе следов памяти, могут вызывать локальные компартиментализованные пресинаптические изменения в нейроне, оставляя остальные нейрональные сетевые функции этого нейрона незатронутыми». В частности, обнаружено, что «деполяризация CGC путем инъекции тока ... снижает аттенюацию кальциевого сигнала (вызванного аксональными спайками) в церебральной ветви аксона. Однако подобный уровень деполяризации не смог изменить амплитуду вызванного спайком кальциевого сигнала в буккальной ветви аксона. Таким образом, именно церебральная ветвь представляется селективным участком, на который воздействует несинаптическая пластичность». *Возникает вопрос: как объяснить такую специализацию церебральной и буккальной ветвей одного и того же аксона?*

6. В работе показано, что «аппликация запаха огурца в концентрации 2, 10 и 50% вызывала изгибания и сокращения, *не инвертируясь или как-то изменяясь после того, как животные продолжительное время находились на диете из огурца*». Автор заключает, что «очевидно, запах огурца был репеллентом и обладал отталкивающими свойствами до обучения и поменял свое биологическое значение после получения животным пищевого подкрепления и приобретения новой памяти». *Вопрос: если репеллент поменял свое биологическое значение после длительной огурцовой диеты, то почему реакции щупалец (изгибания и сокращения) при этом не поменялись (инвертировались)? То есть, репеллент сохранил на этом уровне свое значение? А где же тогда (на каком уровне) произошло изменение «биологического значения» запаха?*

В целом, диссертационное исследование отличается **высоким качеством и инновационным характером** проделанной экспериментальной работы, что является закономерным следствием **высокого уровня профессионализма и исследовательского мастерства** автора.

Название диссертации «Пространственная организация нервной клетки как основа клеточных и сетевых механизмов пластичности» соответствует содержанию выполненных исследований. **Достоверность** полученных результатов **не вызывает сомнения** и обеспечивается использованием адекватных экспериментальных моделей и методов исследования, а также самых современных средств обработки и анализа данных. **Выводы** работы **полностью соответствуют экспериментальным данным**, которые достаточно полно отражены в автореферате и представленных автором 13 публикациях в высокорейтинговых изданиях из списка ВАК.

Диссертация на тему «Пространственная организация нервной клетки как основа клеточных и сетевых механизмов пластичности» полностью соответствует требованиям Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Никитин Евгений Сергеевич, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – Физиология (биологические науки).

Заведующий кафедрой психофизиологии
факультета психологии
МГУ имени М.В. Ломоносова,
доктор психологических наук, профессор

Контакты:
125009, г. Москва, ул. Моховая, д. 11, стр. 9,
факультет психологии МГУ имени М.В. Ломоносова,
кафедра психофизиологии.
Телефон: (495) 6296075.
E-mail: kpf@psy.msu.ru

А.М. Черноризов

Секрет
П. (О.А. Филиппович)