

О Т З Ы В

на диссертацию Никитина Евгения Сергеевича
“Пространственная организация нервной клетки как основа клеточных
и сетевых механизмов пластичности”, представленную к защите на
соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 03.03.01 – физиология.

Актуальность темы диссертационного исследования.

Изучение мембранных (клеточных) механизмов обучения и памяти является одним из актуальных направлений нейробиологии и клеточной физиологии. Это определяется тем, что в основе клеточных и молекулярных механизмов обучения и памяти лежат биофизические и биохимические характеристики нервных клеток, которые дают важное звено в переходе кратковременных пластических изменений в долговременные. Эксперименты на брюхоногих моллюсках и упрощенных моделях, направленные на изучение клеточных основ ассоциативного обучения, оказались результативными применительно к анализу пластичности. Важнейшей компонентой в этих исследованиях является организация нейронной сети того или иного поведения. Формы взаимодействия между элементами нейронной сети в значительной степени зависят от свойств (механизмов) синаптической передачи между нейронами и параметров самих нейронов. Имеющиеся в литературе данные демонстрируют важную роль мембранных характеристик нейронов и параметров синаптической передачи, как для врожденных, так и приобретенных форм поведения. Поэтому исследование организации нейронных сетей и механизмов функционирования этих клеточных структур является важным направлением исследований. Диссертационная работа Е.С. Никитина как раз относится к этой актуальной проблеме современной нейробиологии.

Работа Е.С. Никитина посвящена изучению клеточных и молекулярных механизмов нейронной пластичности, связанной с изменением нейронной возбудимости, принимающей участие в формировании долговременной памяти и адаптивного поведения. Значительное отличие данного исследования от аналогичных заключается в глубоком анализе феномена несинаптической пластичности, как на уровне изменений возбудимости постсинаптических нейронов

и модуляции свойств нейронной сети за счет выброса серотонина модуляторными нейронами, так и на уровне локальных компартиментализованных пресинаптических изменений в нейроне. Диссертант подробно рассматривает вопросы, связанные с нейробиологией обучения и памяти. В этой области физиологии широко используются моллюски, обладающие относительно простой нервной системой с идентифицируемыми клеточными элементами и достаточно сложным поведенческим репертуаром. Важным преимуществом этих животных является также возможность использования полунтактного препарата. В развитие этого подхода ключевую роль внесли сотрудники лаборатории клеточной нейробиологии обучения ИВНДиНФ РАН. Сам диссертант, Е.С. Никитин, является признанным авторитетом в области клеточных механизмов пластичности, результаты которого используют все нейробиологические коллективы нашей страны, и нашей лаборатории в частности.

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций.

Было показано, что внутриклеточная инъекция циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в тело гигантского метацеребрального нейрона (CGC) вызывает значительное увеличение постоянного натриевого тока ($I_{Na(P)}$) в последующие несколько часов и достоверное снижение входного сопротивления и деполяризацию мембраны клеточного тела CGC, что указывает на наличие долговременной цАМФ-зависимой пластичности у CGC. Найдено, что идентифицированные нейроны CGC у улиток *Lymnaea stagnalis* демонстрируют постоянную деполяризацию мембраны, которая возникает между 16-ю и 24-мя часами после обучения. Впервые продемонстрировано, что увеличение $I_{Na(P)}$ в CGC стоит за отставленной постоянной деполяризацией, появляющейся в этом нейроне после обучения животного классическому условному рефлексу с одного подкрепления. 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. Эти экспериментальные данные открывают новые перспективы исследований того, как вызванные обучением изменения на уровне мембранного потенциала обеспечивают форму

долговременной нейрональной пластичности, ранее отмеченную за ее вклад в адаптивные изменения на нейросетевом и поведенческом уровнях.

С использованием методов оптической регистрации в сочетании с электрофизиологической методикой было продемонстрировано, что в обонятельной системе активность процеребрума, как вызванная запахом, так и прямой стимуляцией, оказывает модулирующее тормозное влияние на метациеребральный нейрон, однако обратно активность этого нейрона на осцилляторную активность процеребрума не оказывает заметного влияния. Диссертант впервые провел количественный анализ обонятельного поведения моллюска, базирующийся на 3D реконструкции движений щупалец, и идентифицировал механизм, который связывает их с осцилляторной активностью в ЦНС. Таким образом, на модели простой сенсорной и моторной сети было показано, что в обонятельной системе взаимодействие осцилляторной активности и активности отдельного нейрона играет важную роль в тонкой настройке ориентационного поведения к изменяющимся условиям окружающей среды.

Было показано, что отдельный серотонинергический нейрон (Pd4) может обеспечивать подкрепление в сети оборонительного поведения наземного моллюска. Анализ ответов нейронов серотонинергической группы оптическими и электрофизиологическими методами определил функционирование всей группы как единой сети модуляции оборонительного поведения с одним гигантским «выходным» нейроном, которому остальные нейроны делегируют функцию общения с остальной нервной системой.

Автором сделано 6 общих выводов и 14 отдельных выводов по главам, полностью соответствующих поставленным задачам и основанных на статистически достоверном материале. Диссертант хорошо владеет большим разнообразием методов исследования, умеет обрабатывать и анализировать полученные экспериментальные данные, делать из них правильные выводы. Все это свидетельствует о высокой профессиональной, научной подготовленности диссертанта и его большой эрудиции. По материалам диссертации автором опубликовано 15 работ в самых престижных рецензируемых журналах, в которых полно отражены основные результаты исследований.

Научно-практическая ценность. Исследования по тематике работы находятся на самом высоком мировом уровне в данной области знания. На исследованной модельной системе наземного моллюска *Lymnaea* удалось продемонстрировать участие постоянного натриевого тока в отдельном нейроне в процессах обучения и формирования памяти. Несомненно, такой подход будет применяться и исследованиях нейробиологов, работающих в данной области науки. Совокупность представленных данных о клеточных механизмах обучения и поведении может найти применение при конструировании нейрокибернетических систем и компьютерных моделей мозга. Кроме того, методы оптической регистрации активности нейрональных компартментов и мультинейронной активности с использованием потенциал-зависимых красителей являются инновационными, применяются небольшим числом лабораторий в мире, и все результаты, полученные таким способом, уникальны и не воспроизводимы другими методами.

Оценка объема, структуры и содержания работы.

Диссертация построена по монографической структуре, включает введение, обзор литературы, описание методов исследования, результаты исследования и их обсуждение, оформленное в форме 4-х глав, общее заключение, выводы и список литературы. Диссертация написана на 246 страницах, иллюстрирована 66 рисунками и 1 таблицей. Список цитированной литературы включает 341 работу, из них 4 - отечественных авторов. Объем рукописи представляется оптимальным. Автореферат полностью отражает основные результаты, описанные в диссертации, и их обсуждение.

В разделе «Введение» аргументировано и полно отражены актуальность и значимость исследования, обосновывается выбор темы исследования, корректно сформулированы цель и задачи, научная новизна и практическая значимость работы. Обзор литературы посвящен анализу свойств нервной системы гастропод, как основной модели при исследованиях клеточных основ поведения и памяти и субклеточной локализации сайтов пластичности в нейронах. Рассмотрены сенсорные модальности, роль осцилляции в сети нейронов, виды несинаптической пластичности и их связь с поведением и обучением. В этой части обзор проведен в

основном на примерах прудовика и виноградной улитки. В обзоре проведен подробный анализ современной оптической регистрации функциональной электрической активности нейронов.

Эксперименты были выполнены на трех видах брюхоногих моллюсков: пресноводные улитки *Lymnaea stagnalis*, морские ангелы *Clione limacina* и виноградные улитки *Helix lucorum*. Эксперименты проводили на препаратах обученных улиток либо на полуинтактных препаратах. Электрофизиологическая регистрация включала отведение суммарных потенциалов, внутриклеточное отведение, регистрация методом пэтч-клампа, а также двухэлектродные конфигурации фиксации тока и фиксации потенциала. Большое место и значение в диссертационном исследовании занимают оптические методы регистрации, в разработку и применение которых диссертант внес большой вклад, и перспективам применения которых посвящена 8-я глава. Речь идет о визуализации паттернов концентрации свободного внутриклеточного кальция в объеме цитоплазмы нервной клетки, о методах конфокальной микроскопии и флуоресцентном маркере эндцитоза синаптических везикул. Также необходимо отметить применение поведенческих с применением видеорегистрации и иммуноцитохимических методов. Для решения конкретных вопросов были проведены эксперименты с нейрональной культурой.

Из результатов исследования я выделил бы, прежде всего большую серию экспериментов, описанных в 5 главе «несинаптическая пластичность как основа ассоциативной памяти и увеличения синаптической эффективности». Первая серия экспериментов посвящена анализу свойств постоянного неинактивируемого натриевого тока ($I_{Na(P)}$) как мишени для вызванной цАМФ нейрональной пластичности. Речь идет о токе, который демонстрирует медленную кинетику потенциал-зависимой активации, а также ультра-медленную кинетику инактивации. Он активируется при удерживаемых потенциалах около -90 мВ, достигает максимума приблизительно около -30 мВ и инвертируется при значениях около +35 мВ, не демонстрируя полной инактивации даже при позитивных значениях ступеней тестирующего мембранного потенциала. Получен интересный результат, что этот ток проходит по ионным каналам, отличным от обычных

натриевых. Е.С. Никитиным было показано, что внутриклеточная инъекция циклического аденозин-монофосфата (цАМФ) в тело гигантского метацирерального нейрона (CGC) вызывает значительное увеличение постоянного натриевого тока в последующие несколько часов, а также приводит к появлению пачечных пайковых разрядов и достоверному снижению входного сопротивления и деполяризации мембраны клеточного тела CGC, что указывает на наличие долговременной цАМФ-зависимой пластичности у CGC. Этот результат представляется значительным, особенно с учетом обилия литературных данных о необходимости активации системы цАМФ для обучения. Всегда идут дискуссии о механизмах потенциала покоя (только ли калиевая проницаемость ответственна за него) и поэтому мне представляется очень важным с обще мембранологической точки зрения результат о том, что $I_{Na(P)}$ вносит значительный вклад в мембранный потенциал нейрона CGC.

Серия экспериментов, важная для понимания клеточных механизмов обучения и памяти, была проведена диссертантом по исследованию роли отставленной несинаптической пластичности в долговременной ассоциативной памяти с использованием парадигмы классического условного рефлекса с одного предъявления вместе с электрофизиологическим анализом и оптической регистрации кальция и потенциала. Диссертант показал, что идентифицированные модуляторные нейроны у улиток *Lymnaea stagnalis*, являющиеся внешними по отношению к нейронной сети генератора пищевого ритма, демонстрируют постоянную деполяризацию мембраны, которая возникает между 16-ю и 24-мя часами после обучения. А в экспериментах на полуинтактном препарате было найдено, что искусственная деполяризация этих нейронов облегчает обучение или как выразился автор «деполяризация в CGG достаточна для усиления фиктивного пищевого ответа в ответ на условный пищевой стимул». Используя методы клеточного культивирования нейронов в комбинации с электрофизиологией и оптической регистрацией было показано, что искусственная деполяризация соматической мембраны CGC может привести к изменениям силы синаптических выходов CGC в реконструированной *in situ* синаптической связи и детектируемое повышение уровня кальция. Базируясь на комбинированном подходе, включающем

поведенческие методы, электрофизиологию, иммуногистохимию и компьютерную симуляцию, Е.С. Никитиным было продемонстрировано, что увеличение $I_{Na(P)}$ в CGC стоит за отставленной постоянной деполяризацией, появляющейся в этом нейроне после обучения животного классическому условному рефлексу с одного подкрепления. Взятые вместе, данные по измерению мембранного потенциала до 12 часов, и >24 часов после обучения с измерениями $I_{Na(P)}$ продемонстрировали, что у группы животных с применением сочетанных предъявлений УС/БС вызванная обучением деполяризация мембранного потенциала совпадала по времени с вызванным повышением $I_{Na(P)}$, то есть как до 12 часов, так и после 24 часов после обучения. Дальнейший анализ показал, что связующим звеном между несинаптическими изменениями в нейроне и компартментализованными изменениями в синаптической эффективности служит локальная потенциал-зависимая инактивация калиевого тока А-типа (блокирование быстрого калиевого тока А-типа с помощью 4-аминопиридина). Эти экспериментальные данные открывают новые перспективы исследований того, как вызванные обучением изменения на уровне мембранного потенциала обеспечивают форму долговременной нейрональной пластичности, ранее отмеченную за ее вклад в адаптивные изменения на нейросетевом и поведенческом уровнях.

В следующей серии экспериментов были изучены сенсорная и моторная системы улитки *Helix lucorum* чтобы выяснить, как активные движения периферической обонятельной структуры помогают организовать ориентацию в запаховом пространстве, и как это может быть связано с осцилляторной активностью в процеребральном отделе. В ходе обучения животного запах или его компоненты, который ранее был репеллентом и обладал отталкивающими свойствами, был способен поменять свое биологическое значение после получения пищевого подкрепления, то есть запах может стать более привлекательным после того, как животное приобрело новую память о пище. С использованием методов оптической регистрации в сочетании с электрофизиологической методикой было продемонстрировано, что в обонятельной системе активность процеребрума, как вызванная запахом, так и прямой стимуляцией, оказывает модулирующее тормозное влияние на метацеребральный нейрон, однако обратно активность этого

нейрона на осцилляторную активность процеребрума не оказывает заметного влияния. Таким образом, на модели простой сенсорной и моторной системы было показано, что в обонятельной системе взаимодействие осцилляторной активности и активности отдельного нейрона играет важную роль в тонкой настройке ориентационного поведения к изменяющимся условиям окружающей среды.

Большая серия экспериментов была посвящена изучению модулирующей роли серотонинергических нейронов (прежде всего в качестве подкрепления) в оборонительном поведении улитки *Helix lucorum*. Речь идет о кластере из около 40 серотонинергических нейронов в ростральной части педального ганглия, которые не вызывают самостоятельно определенных форм поведения, но изменяют поведенческие ответы в ответ на неприятные раздражители. Из экспериментов выяснилось, что экстраклеточная активация группы серотонинергических нейронов может служить подкреплением. Было обнаружено, что только в случае тетанизации нейрона Pd4 в качестве подкрепления наблюдалось увеличение амплитуды ВПСП во время процедуры сочетания стимулов. Используя потенциал-зависимые красители и фотодиодную матрицу, диссертант экспериментально охарактеризовал спонтанную и вызванную активности ростральной серотонинергической группы в педальном ганглии целиком. Исследование множественной активности нейронов этой группы показало, что последовательность активации нейронов группы подтверждают концепцию о различной функциональной специализации нейронов группы. Активируемые внешними стимулами нейроны группы способствуют активации других нейронов, включая выходные, модулирующие командные премоторные нейроны оборонительного поведения. Эти результаты позволяют полагать, что активация индивидуального педального серотонинергического модуляторного нейрона Pd4 может вызвать подкрепление.

Благодаря использованию метода оптической регистрации для исследования клеточных механизмов поведения и обучения удалось получить принципиально новые данные, которые невозможно получить другим способом, критически необходимые для понимания процессов пластичности и работы нервной системы. Разработанные подходы позволяют обнаруживать и объяснять явления пластичности на трех уровнях: 1) субклеточном, включая нейрональные отдельные

ветви; 2) клеточном, включая электрическую активность отдельных нейронов; 3) на нейросетевом, включая синхронизованные ответы большого числа нейронов или их пространственно-обособленных компарментов во взаимодействии с управляющими/моторными нейронами, реализующими поведение. Разработанные на системах беспозвоночных методы применимы на млекопитающих и обладают потенциалом для дальнейших исследований. Хотел бы отдельно остановиться на рисунках, предложенных диссертантом, значение которых выше всяких похвал. Это сложные многокомпозиционные рисунки, в которых показаны разные аспекты эксперимента: импульсная активность нейрона или оптической регистрации и сразу несколько вариантов обработки результата с очень подробными подрисуночными подписями.

Работа построена логично, автором выполнены блестящие эксперименты. Диссертация охватывает широкий круг проблем, поэтому при ее чтении возникли некоторые вопросы, в том числе дискуссионного плана.

1. Вопрос: Нейрон CGC – это нейрон модуляторного типа или относится к промежуточному типу.
2. Вопрос: За счет каких механизмов система цАМФ воздействует на $I_{Na(P)}$.
3. Вопрос: Чем отличается инактивация натриевых каналов от их реактивации.
4. Поскольку время инактивации $I_{Na(P)}$ большое, то возникает вопрос – как этот ток соотносится с Ca-током.
5. Стр. 77. По тексту непонятно, протокол с переходом удерживаемого потенциала на другую ступеньку проводился ли на одном и том же изолированном нейроне или все же нейроны были разные.
6. Вопрос: Результат «Деполаризации CGC было достаточно, чтобы увеличить ответ нейронной сети на условный стимул, и это увеличение уже появлялось между 16 и 24 часами после процедуры обусловливания» – такой результат подходит для модуляторного нейрона или для командных нейронов тоже (с. 83).
7. Вопрос: Нейрон CGC – это нейрон, внешний к нейронной сети поведения: какова степень верности такого утверждения (с. 84).
8. Вопрос: Почему все изменения только в нейроне, внешнем к нейронной сети поведения, а как дело обстоит с нейронами внутри самой сети (с. 86).

9. Вопрос: Почему концентрация блокатора калиевых токов А-типа в 20 раз меньше применяемой обычно, наверное, дело в разных препаратах (с. 126).
10. Вопрос: Как Вы можете объяснить тот факт, что соматические спайки в Ваших экспериментах не блокируются кадмием, ведь кадмий обычно блокирует почти все Са-токи (с. 131).
11. Вопрос: Какое у Вас предположение – почему активность нейронов (фоновая и вызванная) в изолированном препарате выше, чем в полуинтактном (стр. 205).
12. Хочу высказать замечание, что диссертант почти не ссылается на наших отечественных ученых в этой области, например, на проф. Д.А. Сахарова с его идеей о модулирующей роли серотонина.

Несколько перечисленных выше замечаний не умаляют несомненных достижений диссертанта, обнаруженных им новых научных данных.

Заключение

Таким образом, представленная к защите диссертация Е.С. Никитина на тему: “Пространственная организация нервной клетки как основа клеточных и сетевых механизмов пластичности”, представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, посвящена решению актуальной задачи физиологии – изучению клеточных и молекулярных механизмов нейронной пластичности, обучения и формирования долговременной памяти. Работа имеет как теоретическую, так и практическую ценность. Целесообразно использовать данные, представленные в диссертации, при чтении курсов лекций по физиологии ЦНС в высших учебных заведениях биологического и медицинского профиля.

Актуальность темы, научная новизна полученных результатов и сделанных выводов дают основание считать, что диссертация является целостным и законченным научно-квалификационным исследованием, соответствующим требованиям п.8 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г., № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор – Никитин Евгений Сергеевич заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник OpenLab «Нейробиология»,
профессор кафедры физиологии человека и животных
Института фундаментальной медицины и биологии
Казанского (Приволжского) федерального университета,

доктор биологических наук, профессор  Х.Л. Гайнутдинов

