

25 февраля 2015 года на заседании Диссертационного совета Д.002.044.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук состоялась защита диссертации Никитина Евгения Сергеевича «Пространственная организация нервной клетки как основа клеточных и сетевых механизмов пластичности» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – «Физиология», биологические науки.

На заседании присутствовало 19 членов совета, из них 13 докторов наук по специальности « физиология» - 03.03.01 - биологические науки:

Анохин К.В. ., 03.03.01	Иерусалимский В.Н., 03.03.01
Базян А.С., 03.03.01	Косицын Н.С., 03.03.01
Балабан П.М., 03.03.01	Костандов Э.А., 03.03.01
Богданов А.В., 03.03.01	Лебедева Н.Н., 03.03.01
Болдырева Г.Н., 03.03.01	Мержанова Г.Х., 03.03.01
Григорьян Г.А., 03.03.01	Раевский В.В., 03.03.01
Гуляева Н.В., 03.03.01	Стрелец В.Б., 03.03.01
Дорохов В.Б., 03.03.01	Урываев Ю.В., 03.03.01
Захаров И.С., 03.03.01	Шульговский В.В., 03.03.01
Иваницкий А.М., 03.03.01	

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 13 докторов наук по специальности 03.03.01 – «физиология», биологические науки, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 18, против – нет, недействительных бюллетеней - 1.

Диссертационный совет принял решение присудить Никитину Евгению Сергеевичу ученую степень доктора биологических наук.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.044.01
на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии
Российской академии наук
по диссертации на соискание ученой степени доктора наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 25.02. 2015 г № 2

О присуждении Никитину Евгению Сергеевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация Никитина Е.С. «Пространственная организация нервной клетки как основа клеточных и сетевых механизмов пластичности» по специальности 03.03.01 – «Физиология» принята к защите 22 октября 2014 года, протокол № 2, Диссертационным советом Д.002.044.01, на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук (117485, г. Москва, ул. Бутлерова 5-а), созданным в соответствии с Приказом № 1216-в от 29 декабря 2000 г. ВАК Министерства образования РФ, продлены полномочия Приказом № 2059-2001 от 5 октября 2009 г. Федеральной службы по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор) в количестве 24 человек на период действия номенклатуры специальностей научных работников, утвержденной приказом Минобрнауки России от 25.02.2009 г. № 59)

Соискатель Никитин Евгений Сергеевич 1974 года рождения, гражданин Российской Федерации, в настоящее время работает старшим научным сотрудником в лаборатории клеточной нейробиологии обучения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва.

Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Роль процеребрума наземного моллюска *Helix* в восприятии запахов и

формировании поведения» защитил в 2003 году, в диссертационном совете Д.002.044.01, созданном на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук.

Диссертация «Пространственная организация нервной клетки как основа клеточных и сетевых механизмов пластичности» в виде рукописи по специальности 03.03.01 – «Физиология» выполнена в лаборатории клеточной нейробиологии обучения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва.

Научный консультант: Балабан Павел Милославович, гражданин РФ, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клеточной нейробиологии обучения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва.

Официальные оппоненты:

- Гайнутдинов Халил Латыпович, гражданин РФ, доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник Open Lab «Нейробиология» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань.

- Дьяконова Варвара Евгеньевна, гражданка РФ, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нейробиологии развития Института биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН

- Черноризов Александр Михайлович, гражданин РФ, доктор психологических наук, профессор, заведующий кафедрой психофизиологии Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, г. Москва.

Оппоненты дали положительные отзывы о диссертации, содержащие ряд непринципиальных замечаний и вопросов.

Ведущая организация Учреждение Российской академии наук институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург, в своем положительном заключении, подписанном заведующей лабораторией нейрогенетики, доктором биологических наук Е.В. Савватеевой-Поповой и ученым секретарем института, кандидатом биологических наук А.Е Чуйкиным и утвержденном директором института членом-корреспондентом РАН Д.П. Дворецким указала, что диссертация Никитина Е.С. «Пространственная организация нервной клетки как основа клеточных и сетевых механизмов пластичности» является научно-квалификационной работой, которая представляет существенный вклад в науку, а ее автор достоин присуждения искомой степени.

Соискатель имеет 15 опубликованных работ, из них по теме диссертации 13 работ общим объемом 5,5 печатных листов, в том числе 7 статей в международных журналах, 6 статей в отечественных журналах, рекомендованных ВАК.

Наиболее значимые научные работы 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. Журн. Высш. Нерв. Деят. 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. 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. 2(5): 472-478.
3. Никитин Е. С., Н. А. Асеев, П. М. Балабан. (2013) Усовершенствованная оптическая регистрация нейрональной активности с использованием

- потенциал-зависимых красителей. Журн. Высш. Нерв. Деят. им. И.П.Павлова. 6 (63): 656-66.
4. Никитин Е.С. Балабан П.М. (2011) Структурно-функциональная организация сети серотонинергических нейронов наземной улитки. Журн. Высш. Нерв. Деят. им. И.П.Павлова. 2011, 61(6): 750–762.
 5. Норемян Т.П., Никитин Е.С., Браваренко Н.И., Малышев А.Ю., Балабан П.М. (2001) Фазозависимая координация двух моторных программ в буккальном ганглии крылоногого моллюска. Журн. Высш. Нерв. Деят. Т. 51(6):717-22.
 6. 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. 13;212(1):17-27.
 7. 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; 75(1):30-50.
 8. 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.
 9. Nikitin ES, Zakharov IS, Samarova EI, Kemenes G, Balaban PM. (2005) Fine tuning of olfactory orientation behavior by the interaction of oscillatory and single neuronal activity. Eur J Neurosci. 2005; 22(11):2833-44.
 10. 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; 95(1):453-63.
 11. 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; 16:1269-79.

12. 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.; 194(1):19-26.

13. 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.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы

- совместный отзыв от ведущего научного сотрудника лаборатории биофизики синаптических процессов Учреждения РАН Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, доктора биологических наук, профессора Э.А.Бухараевой и старшего научного сотрудника той же лаборатории, кандидата биологических наук Д.В.Самигуллина. Отзыв положительный.

- от ведущего научного сотрудника Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, доктора биологических наук, доцента Е.А.Климова. Отзыв положительный.

Во всех отзывах отмечается, что проделана большая работа, проведен тщательный анализ полученных результатов. Получены новые данные, автор заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что они являются компетентными в данной отрасли науки учеными, имеют публикации в сфере исследования, соответствующей теме диссертации, и дали на это свое согласие.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что она широко известна своими достижениями в данной отрасли науки и способна определить научную и практическую ценность диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований показано, что компартиментализация строения

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

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что методы оптической регистрации активности нейрональных компартментов и мультинейронной активности с использованием потенциал-зависимых красителей являются инновационными, применяются небольшим числом лабораторий в мире, и результаты, полученные таким способом, уникальны, не воспроизводимы другими методами и имеют важнейшее значение для формирования новых теорий о хранении памяти. На сегодняшний день использованная в данной работе модельная система наземного моллюска *Littorina* – единственный объект, где удалось продемонстрировать участие постоянного натриевого тока в отдельном нейроне в процессах обучения и формирования памяти. Сравнение проведения потенциала по аксону моллюска и млекопитающего выявило общность его механизмов на этих системах. В работе продемонстрировано изменение проводимости, которое напрямую связано с локализацией пресинапсов нейрона, подвергающегося пластической перестройке, а также показана связь с обучением в прямом эксперименте, подобный которому на сегодняшний день на млекопитающих пока невозможен.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что совокупность представленных данных о клеточных механизмах обучения и поведении может найти применение при конструировании нейрокибернетических систем и компьютерных моделей мозга. Внедрение описанных в работе методов оптической регистрации позволит разработать новые подходы в нейрохирургии и более точно оценить

эффективность и безопасность воздействий на мозг. Разработанные на системах беспозвоночных методы применимы на млекопитающих и обладают потенциалом для дальнейших исследований.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что диссертация содержит обширный экспериментальный материал. Для работы использовались взрослые виноградные улитки *Helix lucorum L.*, пресноводные улитки *Lymnaea stagnalis*, крысы линии Wistar. Работа на моллюсках выполнена на препаратах изолированной ЦНС, или ЦНС с нервами и периферическими структурами. Срезы зрительной коры крыс Wistar P15-P21 (300 мкм) приготавливали на вибраторе.

Электрофизиологическая регистрация. Для экстраклеточного отведения активности использовали присасывающие электроды. Клеточную активность от нервов отводили *en passant*. Внутриклеточное отведение проводили стеклянными микроэлектродами. Для регистрации методом пэч-кламп использовали стандартные внутриклеточный раствор и искусственную цереброспинальную жидкость. Аппликацию фармакологических веществ проводили микропипеткой.

Оптическая регистрация. Сигнал, получаемый при регистрации электрической активности нейронных структур оптическими методами, представляет собой сумму мембранных потенциалов нейронов, проецируемых на фоточувствительные элементы матрицы. Микроскоп крепился к антивибрационному основанию. До препарата свет проходил через тепловой фильтр и фильтр с необходимой полосой пропускания. Сигнал усиливали и оцифровывали на 12-битном АЦП DAPL 3000A. Пространственное разрешение составляло 0.05 мм на элемент матрицы для ЛК x25, и 0.06 мм для объектива x20. Регистрацию проводили с использованием витальных потенциал-зависимых красителей: RH-155, JPW-1131, JPW1114 и JPW1150. Для доставки красителей в срезы мозга также использовали биолистическую установку и золотые микропржектили

диаметром 1.6 мкм. Визуализацию окрашивания проводили лазерным сканирующим конфокальным микроскопом LSM 5 live (Zeiss) с лазерами 405, 488 и 532 нм. Также использовали оптическую регистрацию концентрации свободного кальция с флуоресцентным кальций-чувствительным зондом Oregon Green 488 Bapta 1. Для регистрации использовали флуоресцентный микроскоп и систему NeuroCCD (80x80 элементов).

Поведенческие эксперименты. Для изучения биологического значения запаха использовали протокол выработки условного рефлекса в специальной экспериментальной установке, для чего улитку прикрепляли за раковину и позволяли двигаться по электропроводящему шару, плавающему в растворе NaCl. Обучение проводили в продолжение 16-20 дней, осуществляя по одному сочетанию в день. Улиток *Lymnaea* обучали пищевому рефлексу, сочетая водорастворимые стимулы амил-ацетата и сахарозы. Контрольной группе предъявляли несочетанные предъявления стимулов, разделенных по времени на 1 час. Тестирование условного рефлекса проводили с использованием двойного слепого контроля. Критерием служило число жеваний за период в 2 мин, или «фиктивные жевания», зарегистрировавшиеся как спайковый разряд в моторных нервах на препарате.

Личный вклад соискателя состоит в получении соискателем исходных данных, обработке и интерпретации экспериментальных данных, подготовке основных публикаций по выполненной работе.

Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной задачи и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием продуманного плана исследований, адекватностью использованных методов, концептуальностью работы и взаимосвязанностью выводов.

На заседании 25 февраля 2015 года диссертационный совет принял решение присудить Никитину Евгению Сергеевичу ученую степень доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 13 докторов наук по специальности 03.03.01 – «физиология», биологические науки, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 18, против - нет, недействительных бюллетеней - 1.

Председатель диссертационного совета

Член-корреспондент РАН

Балабан Павел Милославович

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор биологических наук

Иерусалимский Виктор Николаевич

25 февраля 2015 г.