



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ**

**Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт теоретической и
экспериментальной биофизики
Российской академии наук
(ИТЭБ РАН)**

142290 Пушкино Московской области,
ул. Институтская, 3
Тел. (495) 632-78-69 Факс (4967) 33-05-53
E-mail: office@iteb.ru
ОКПО 00454592, ОГРН 1025007770920
ИНН/КПП 5039002070/1025007770920

В диссертационный Совет
при ФГБНУ Научно-исследовательский
институт физиологии и фундаментальной
медицины

(Д 001.014.01)

0310 16 № 12308/2171-02

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Институт
теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук»

профессор Д.Ф.И.

/И.П. Белецкий/

03 " октября 2016 г.

О Т З Ы В

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации
Лисачева Павла Дмитриевича
«Нейропластичность и экспрессия генов
(нейро-глиальное взаимодействие и формирование долговременной потенциации
синаптической передачи)»,
представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.03.01 – Физиология

1. Актуальность диссертационной работы

Диссертация Павла Дмитриевича Лисачева посвящена исследованию механизмов нейрональной пластичности, лежащей в основе обучения и памяти, – проблемы, являющейся наиболее глобальной в современной нейрофизиологии. Наиболее ярким проявлением нейропластичности является долговременная потенциация синаптической передачи (ДВП),

природа которой до конца не выяснена. Поздняя фаза ДВП, как известно, требует синтеза новых белков и экспрессии генов, играющих важную роль в процессах нейропластичности. Обычно рассмотрение этого вопроса ограничивается процессами, происходящими в нейронах. Между тем, нейронная активность изменяет секрецию многих глиальных продуктов, модулирующих синаптическую передачу, однако вклад генетического аппарата глиальных клеток в синаптическую пластичность практически не был известен. Отсюда очевидно, что изучение связи нейропластичности с экспрессией глиальных генов является актуальной задачей нейрофизиологии.

2. Связь с планами науки и народного хозяйства в области нейробиологии и медицины

Диссертационная работа непосредственно связана с необходимостью понимания механизмов когнитивной работы мозга, ключевым процессом в которой является нейрональная пластичность. Выяснение механизмов формирования долговременной потенциации синаптической передачи необходимо для расшифровки причин возникновения многих нейродегенеративных заболеваний, нарушающих когнитивные функции мозга, и для создания новых подходов при их терапии.

3. Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Проведенное П.Д. Лисачевым исследование, несомненно, расширяет понимание тонких клеточных механизмов пластических изменений, лежащих в основе обучения и памяти. В диссертационной работе впервые выявлены закономерности участия генетического аппарата глии в механизмах нейропластичности и роль транскрипционного фактора p53 в регуляции генов при формировании ДВП. Четко доказано, что зависимые от клеточной активности пластические процессы могут сопровождаться изменением транскрипции генов в одном из клеточных типов глии, астроцитах. Для получения этого результата автором, в частности, разработана модель связанной с нейрональной пластичностью экспрессии генов семейства *S100* в срезах гиппокампа крыс. Показано, что индукция ДВП в поле CA1 срезов гиппокампа крыс сопровождается увеличением количества мРНК и белка *S100B* и мРНК *S100A1*. Относительно *S100B* исследованы механизмы индукции его экспрессии при формировании ДВП на уровне внутриклеточных регуляторных каскадов, что является новым достижением современной нейронауки. На основании комплекса таких экспериментов и данных литературы предложена схема регуляции экспрессии *S100B* при формировании ДВП. Показано, что в качестве ключевых посредников влияния тетанизации на экспрессию *S100B* выступают Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые протеинкиназы.

Одним из транскрипционных факторов, контролирующих зависимую от нейронной активности экспрессию *S100B*, оказался p53, что является первым свидетельством его

участия в регуляции генов при ДВП. Исследована также экспрессия мишеней p53 и оценен вклад p53 в их регуляцию в ранней фазе ДВП. Обнаружено при этом, что формирование ДВП сопровождается избирательным изменением экспрессии генов-мишеней p53. Идентифицирована группа генов, в регуляции которых при ДВП принимают участие нутлин-3-зависимые факторы, к которым принадлежит p53. Эта группа включает в себя некоторые мишени p53 из семейства *Bcl2*: впервые показано, что в ранней фазе ДВП увеличивается экспрессия проапоптозного белка Вах и уменьшается экспрессия антиапоптозного белка *Bcl2*.

На основании полученных результатов автор делает вывод, что к вероятным функциям p53-зависимого компонента транскрипционной программы ДВП могут быть отнесены трофическая поддержка клеток мозга в условиях повышенной функциональной нагрузки и гомеостатическое ограничение эффективности возбуждающих синапсов.

Важным новым результатом является оценка роли транскрипционных факторов комплекса AP-1 (Fos, Jun, JunB), *Egr1* в индукции экспрессии *S100* при ДВП. Идентифицированы факторы, ограничивающие активность p53 при ДВП. Сделан интересный и важный вывод, что в процессе сохранения новой информации в нейроглиальной сети скоординированная работа генетических аппаратов нейронов и глиальных клеток формирует комплекс разнонаправленных влияний, обеспечивающих сбалансированность модификаций синаптических связей, необходимую для стабильного функционирования мозга.

4. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Исследование проведено на высоком методическом уровне. Диссертационные данные (полученные на 1085 срезах гиппокампа, взятых от 301 крысы Wistar) явились результатом как электрофизиологических (регистрация популяционных спайков), так и биохимических экспериментов (включая иммунохимическую детекцию белков), а также молекулярного анализа (определение уровня мРНК посредством проведения ПЦР в реальном времени). Благодаря такому набору методических подходов, автору удалось получить данные, достоверность выводов и заключений из которых не вызывает сомнений.

5. Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению

Диссертационная работа объемом 200 страниц состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка сокращений и указателя цитируемой литературы. Список цитируемой литературы включает 446 источников. Диссертация иллюстрирована 26

рисунками, содержит 8 таблиц. Обзор литературы содержит всю необходимую информацию по исследуемой теме.

Каких-либо существенных недостатков в научной части работы не обнаружено, однако хотелось бы выразить сожаление по поводу того, что проделанная работа ограничена экспериментами на переживающих срезах гиппокампа (*in vitro*) и не включает в себя опытов на целом мозге (*in vivo*). Такие эксперименты могли показать универсальность сделанных выводов относительно нейро-глиальных взаимодействий в формировании долговременной потенциации синаптической передачи. Однако это замечание никак не снижает ценности проведенной работы, и является скорее пожеланием на будущее.

Актуальность и новизна работы, достоверность и четкость полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации, позволяют оценить работу как завершённую, замечаний по оформлению нет.

6. Соответствие автореферата основным положениям диссертации

В автореферате, содержание которого по форме и существу соответствует диссертации, автором четко описаны актуальность рассматриваемой проблемы, цель исследования, научная новизна полученных результатов, практическая ценность работы, объекты и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, и выводы.

7. Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты, изложенные в диссертации, полностью отражены в отечественной (18 публикаций) и зарубежной (3 статьи) печати.

8. Значимость для науки и производства полученных результатов

Выяснение механизмов нейрональной пластичности, лежащей в основе многих когнитивных процессов в мозге, прежде всего механизмов памяти, имеет приоритетное значение в современной нейробиологии. В этом аспекте расшифровка тонких механизмов долговременного изменения синаптической эффективности помогает понять то, как происходит запоминание, а значит и то, как работает мозг вообще. Проведенное комплексное изучение нейро-глиальных взаимодействий в формировании долговременной потенциации синаптической передачи впервые продемонстрировало увеличение экспрессии гена, кодирующего специфичный для глиальных клеток белок S100B, после индукции долговременной потенциации в поле CA1 гиппокампа. Кроме этого, выявлено, что убиквитинлигаза Mdm2 и деацетилаза Sirt1 существенно ограничивают базальный уровень мРНК S100B, а его увеличение, индуцированное высокочастотной стимуляцией афферентных волокон, зависит от глутаматных рецепторов NMDA-типа и Ca²⁺/кальмодулин-зависимых протеинкиназ. Также впервые обнаружен интересный факт, демонстрирующий,

что индукция ДВП в гиппокампе сопровождается временным увеличением связывания p53 с промотором гена *S100B*, что и является одной из причин изменения его экспрессии. Все эти факты проливают свет на механизмы нейропластичности, обеспечивающие сложные функции мозга.

Практическое значение. Интерес к механизмам регуляции экспрессии генов семейства *S100* (*S100B* и *S100A1*) связан не только с их возможным участием в нейропластичности, но и с вовлечением этих белков в патологические процессы. В частности, аллель *S100B*, характеризующийся повышенным уровнем экспрессии, является фактором риска развития биполярного расстройства (Dagdan et al., 2011). Идентификация регуляторной сети, контролирующей экспрессию *S100B*, может быть полезна для выяснения причин увеличения уровня этого белка в мозге в патологических условиях, а также для оценки перспектив использования регуляторных факторов в качестве мишеней фармакологического воздействия. Результаты работы открывают также новое направление в исследовании молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности при анализе действия биологически активных веществ.

9. Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты и выводы диссертации могут быть использованы в курсах лекций по нейрофизиологии и физиологии человека и животных в высших учебных заведениях. Полученные результаты будут также полезны для проведения дальнейших исследований в ряде профильных институтов РАН, таких, как Институт цитологии и генетики СО РАН в Новосибирске (Лаборатория функциональной нейрогеномики) и Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (Лаборатория молекулярной нейробиологии). Полученные факты могут быть использованы при экспериментальном и математическом моделировании отдельных заболеваний (депрессии и др.), для изучения изменений в долговременной потенциации синаптической передачи в мозге животных, выявляющих признаки этих заболеваний.

10. Заключение

Диссертация представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу на актуальную тему. Полученные в работе данные представляют собой определенный прорыв в области знаний о природе нейропластичности и вносят большой вклад в понимание механизмов работы мозга в целом. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений не вызывает сомнений.

Таким образом, диссертация Лисачева Павла Дмитриевича является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как

научное достижение, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Отзыв составлен руководителем лаборатории Системной организации нейронов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, д.б.н. Валентиной Федоровной Кичигиной, обсужден и одобрен на заседании секции «Межклеточные взаимодействия и нейронаука» 14 сентября 2016 г., протокол № 18.

Председатель секции, в.н.с. лаб. Экспериментальной нейробиологии,
д.б.н.

АИ /В.И. Архипов/

Рук. лаб. Системной организации нейронов,
д.б.н.

Кич /В.Ф. Кичигина/



Подпись: *Груздева В.В.*
Кичигина В.Ф.
УДОСТОВЕРЯЮ - ЗАВ. ЛАБ.
Е. В. ГРУЗДЕВА