

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Конструкторско-технологического
института вычислительной техники
Сибирского отделения Российской
академии наук



Д.Ф.М.И.

С.К. Голошко

2016 г.

УТВЕРЖДАЮ

Врио директора Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения "Научно-исследовательский
институт молекулярной биологии и
биофизики"



В.А. Мордвинов

2016 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Конструкторско-технологического института вычислительной техники
Сибирского отделения Российской академии наук и
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
"Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики"

Диссертация "Нейропластичность и экспрессия генов (нейро-глиальное взаимодействие и формирование долговременной потенциации синаптической передачи)" выполнена в лаборатории биомедицинской информатики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Конструкторско-технологического института вычислительной техники Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, и в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики", г. Новосибирск.

В период подготовки диссертации соискатель Лисачев Павел Дмитриевич работал в должности ведущего научного сотрудника в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Конструкторско-технологическом институте вычислительной техники Сибирского отделения Российской академии наук и, по совместительству, в должности научного сотрудника проектов Российского Фонда Фундаментальных Исследований в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики".

Лисачев Павел Дмитриевич в 2001 году защитил диссертацию по теме "Исследование роли командных нейронов оборонительного поведения в механизмах долговременной сенситизации" на соискание ученой степени кандидата биологических наук в Научно-исследовательском Институте физиологии СО РАМН по специальности 03.00.13 – "Физиология": решение диссертационного совета НИИФ СО РАМН от 28 июня 2001 г. № 8, диплом кандидата наук КТ № 056953 выдан в Москве 5 октября 2001 г.

Научный консультант – академик РАН, доктор биологических наук, профессор Штарк Маркс Борисович, основное место работы: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», главный научный сотрудник лаборатории компьютерных систем биоуправления.

По итогам обсуждения диссертации "Нейропластичность и экспрессия генов (нейро-глиальное взаимодействие и формирование долговременной потенциации синаптической передачи)" принято следующее заключение:

Актуальность и соответствие специальности

Диссертация направлена на решение фундаментальной проблемы выяснения связи нейропластичности с экспрессией генов на модели долговременной потенциации (ДВП) – одного из ключевых физиологических механизмов обучения и памяти. Особенность работы заключается в том, что она ориентирована на: 1) изучение влияния нейронной активности на экспрессию генов в глиальных клетках; 2) доказательство участия транскрипционного фактора p53 в регуляции экспрессии генов, ассоциированной с формированием долговременной потенциации.

Экспрессия генов играет важную роль в процессах нейропластичности. Изучению динамики транскриптома при формировании долговременной потенциации и обучении посвящено значительное число работ, но круг нерешенных проблем остается далеко не исчерпанным. Традиционно рассмотрение этого вопроса ограничивается процессами, происходящими в нейронах. Между тем, нейронная активность влияет на секрецию из глии многих факторов, модулирующих синаптическую передачу и жизнеспособность клеток, включая белковые молекулы, такие как цитокины и ростовые факторы, однако роль генетического аппарата глии в этих изменениях практически неизвестна. Кроме того, в последнее десятилетие появились свидетельства вовлечения элементов системы апоптоза (каспаз и белков семейства Bcl2) в механизмы синаптической пластичности. При этом роль транскрипционного фактора p53, важнейшего регулятора апоптоза, в контроле экспрессии генов, связанной с нейропластичностью, ранее не изучалась.

В связи с этим диссертационная работа Лисачева П.Д., посвященная исследованию указанных выше проблем, представляется *актуальной*. Содержание работы полностью *соответствует* специальности 03.03.01 – Физиология.

Новизна и практическая значимость

В работе получены следующие *основные результаты*:

1) Впервые продемонстрировано увеличение экспрессии гена, кодирующего специфичный для глиальных клеток белок S100B, после индукции долговременной потенциации в поле CA1 гиппокампа.

2) Исследовано влияние различных элементов внутриклеточных регуляторных каскадов на базальную и зависимую от нейронной активности экспрессию S100B. Показано, 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.

3) Впервые доказано участие транскрипционного фактора p53 в регуляции генов при формировании долговременной потенциации. Обнаружено, что индукция ДВП в гиппокампе сопровождается временным увеличением связывания p53 с промотором гена S100B, что и является одной из причин изменения его экспрессии.

4) Выявлено снижение количества белка p53 при формировании ДВП и показана ключевая роль Mdm2 и Sirt1 в этом феномене.

5) Идентифицирована группа генов, в регуляции которых при ДВП принимают участие нутлин-3-зависимые факторы, к которым принадлежит p53. Эта группа включает в себя, в частности, некоторые мишени p53 из семейства Bcl2: впервые показано, что в ранней фазе ДВП увеличивается экспрессия проапоптозного белка Вах и уменьшается экспрессия антиапоптозного белка Bcl2.

Сформулированные в работе выводы соответствуют полученным результатам.

Исследования выполнялись в соответствии с планами научно-исследовательских работ КТИ ВТ СО РАН по программам фундаментальных научных исследований государственных академий наук по проектам VI.53.1.3. "Экспериментальный, биофизический анализ клеточных механизмов нейропатологий на модельных нейронных системах *in vitro*, поиск методов и средств коррекции" (№ гос. регистрации 01201000798), IV.35.1.5 "Теоретико-экспериментальный анализ принципов и механизмов когнитивности биологических нейронных информационных систем" (№ гос. регистрации 01201362078) и поддерживались грантами РФФИ на проведение инициативных исследований (проекты 09-04-00200-а, 12-04-00464-а и 15-04-01753-а).

Полнота изложения в работах соискателя

Основные результаты работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях в соответствии с п.11 "Положения о присуждении ученых степеней" (ПП РФ №842). Полученные автором результаты отражены в следующих публикациях:

1. Соколова О.О., Штарк М.Б., Лисачев П.Д. и др. Экспрессия генов S100B и S100A6 при долговременной посттетанической потенциации в гиппокампе // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2009. – Т. 148. – № 8. – С. 195-198. Перевод: Bull. Exp. Biol. Med. – 2009. – V. 148. – N 2. – P. 227-229.
2. Соколова О.О., Штарк М.Б., Лисачев П.Д. и др. Динамика экспрессии "ранних" генов при долговременной посттетанической потенциации в поле CA1 гиппокампа крысы // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2009. – Т. 148. – № 9. – С. 304-306. Перевод: Bull. Exp. Biol. Med. – 2009. – V. 148. – N 3. – P. 416-418.
3. Lisachev P.D. et al. A Comparison of the dynamics of S100B, S100A1, and S100A6 mRNA expression in hippocampal CA1 area of rats during long-term potentiation and after low-frequency stimulation // Cardiovasc. Psychiatry Neurol. – 2010. – V. 2010. – Article ID 720958, 6 pages (DOI: 10.1155/2010/720958).
4. Pustyl'nyak V.O., Lisachev P.D. et al. Regulation of S100B gene in rat hippocampal CA1 area during long term potentiation // Brain Res. – 2011. – V. 1394. – P. 33-39 (DOI: 10.1016/j.brainres.2011.04.025).
5. Лисачев П.Д. и др. Индукция экспрессии гена S100B при долговременной потенциации в поле CA1 гиппокампа зависит от активности рецепторов NMDA-типа // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2012. – Т. 154. – № 10. – С. 481-484. Перевод: Bull. Exp. Biol. Med. – 2013. – V. 154. – N 4. – P. 485-488.
6. Лисачев П.Д. и др. Экспрессия генов семейства Bcl2 в ранней фазе долговременной потенциации // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2014. – Т. 158. – № 7. – С. 86-88. Перевод: Bull. Exp. Biol. Med. – 2014. – V. 158. – N 1. – P. 77-79 (DOI: 10.1007/s10517-014-2696-5).
7. Лисачев П.Д. и др. Регуляция экспрессии S100B при долговременной потенциации // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. – 2014. – Т. 100. – № 8. – С. 953-963. Перевод: Neurosci. Behav. Physiol. – 2016. – V. 46. – N 3. – P. 312-318 (DOI: 10.1007/s11055-016-0235-8).

8. Лисачев П.Д. и др. Mdm2-зависимая регуляция экспрессии p53 при долговременной потенциации // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2014. – Т. 158. – № 9. – С. 317-319. Перевод: Bull. Exp. Biol. Med. – 2015. – V. 158. – N 3. – P. 333-335 (DOI: 10.1007/s10517-015-2755-6).
9. Pustyl'nyak V.O, Lisachev P.D., Shtark M.B. Expression of p53 target genes in the early phase of long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 area // Neural Plast. – 2015. – V. 2015. – Article ID 242158, 12 pages (DOI: 10.1155/2015/242158).
10. Лисачев П.Д. и др. Sirt1 регулирует стабильность p53 и экспрессию его мишени S100B при долговременной потенциации в гиппокампе крыс // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2015. – Т. 160. – № 10. – С. 429-431. Перевод: Bull. Exp. Biol. Med. – 2016. – V. 160. – N 4. – P. 432-434 (DOI: 10.1007/s10517-016-3189-5).

В работах [1-4] представлена динамика экспрессии генов S100B, S100A1 и некоторых ранних генов транскрипционных факторов после индукции долговременной потенциации в поле CA1 гиппокампа. В [3] продемонстрирована зависимость экспрессии S100B и S100A1 от частоты нейронной активности.

В работах [5, 7, 9, 10] исследовано влияние различных ингибиторов внутриклеточных регуляторных факторов на базальную и зависимую от нейронной активности экспрессию S100B. В [4] впервые доказано, что индукция ДВП в гиппокампе сопровождается увеличением связывания транскрипционного фактора p53 с промотором гена S100B и одновременным уменьшением количества белка p53. Зависимость индуцированной высокочастотной стимуляцией деградации p53 от Mdm2 и Sirt1 показана в [8, 10].

В работе [6] впервые продемонстрировано, что в ранней фазе ДВП меняется экспрессия генов-мишеней p53 из семейства Bcl2: увеличивается экспрессия гена проапоптозного белка Вах и уменьшается экспрессия гена антиапоптозного белка Bcl2. В [9] идентифицирована группа генов, в регуляции которых при ДВП принимают участие нутлин-3-зависимые факторы, к которым принадлежит p53.

Научные результаты, в *полном объеме* отражающие содержание диссертации, *опубликованы* в 21 работе. В их числе 11 статей в журналах, рекомендуемых ВАК РФ для публикации результатов диссертаций, и 10 работ в трудах российских и международных конференций.

Личное участие

Все выносимые на защиту результаты получены с участием соискателя. Соискателю принадлежит следующее: выбор параметров электрофизиологической модели нейропластичности, идеи применения ингибиторов клеточных сигнальных молекул для изучения механизмов выявленных феноменов, проведение электрофизиологических экспериментов, обработка и анализ основного полученного материала. Конфликт интересов с соавторами отсутствует.

Достоверность результатов

Диссертационная работа Лисачева П.Д. выполнена на высоком уровне с применением современных физиологических и молекулярно-биологических методов анализа. Защищаемые результаты *достоверны*, теоретически строго обоснованы, обладают необходимыми элементами *новизны* и имеют *теоретическое значение*. Все результаты диссертации прошли положительную апробацию на ряде конференций в России и за рубежом. Среди них: Всероссийская конференция с международным участием «Гиппокамп и

память: норма и патология» (Пушино, 2009, 2012, 2015); научная конференция «Медицинская геномика и протеомика» (Новосибирск, 2009); Всероссийская конференция с международным участием «Современные направления исследований функциональной межполушарной асимметрии и пластичности мозга» (Москва, 2010); Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2013, 2015).

Кроме того, результаты диссертации докладывались и получили положительную оценку на Межлабораторном семинаре по генетике животных Института Цитологии и Генетики СО РАН (2014).

Представленная диссертация является *самостоятельной* и *законченной* научно-исследовательской работой, подводящей итог многолетним и плодотворным исследованиям соискателя, на основании которых был сформулирован ряд закономерностей, характеризующих нейроглиальное взаимодействие в контексте синаптической пластичности, совокупность которых можно квалифицировать как *научное достижение*. Таким образом, диссертация соответствует требованиям п.9, абзац 1 "Положения о присуждении ученых степеней" (ПП РФ №842).

Диссертация "Нейропластичность и экспрессия генов (нейро-глиальное взаимодействие и формирование долговременной потенциации синаптической передачи)" Лисачева Павла Дмитриевича рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – Физиология.

Заключение принято на основании решения межинститутского семинара Конструкторско-технологического института СО РАН и НИИ молекулярной биологии и биофизики.

Присутствовало на заседании 22 человека. Результаты голосования: "за" – 22 чел., "против" – нет, "воздержались" – нет, протокол № 1 от 16 мая 2016 года.

Ратушняк Александр Савельевич

Председатель семинара, зав. лабораторией биомедицинской информатики КТИ ВТ СО РАН, д.б.н.



Подпись А.С. Ратушняк на удостоверение
Заведующий отделом кадров НИИМББ
М.С. Чернова Т.А.
23.05.2016.

Сафронова Ольга Геннадьевна

Секретарь семинара, уч. секретарь НИИМББ, к.б.н.

Личную подпись *Сафронова О.Г.* заверяю
Начальник отдела кадров НИИМББ
"23" мая 2016 г. Подпись *М.С. Чернова Т.А.*