

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию
Лисачева Павла Дмитриевича
“Нейропластичность и экспрессия генов (нейро-глиальное взаимодействие и формирование долговременной потенциации синаптической передачи)”, представленную к защите на соискание
ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.03.01 – физиология.

Актуальность темы диссертационного исследования.

Существует огромное количество фактических данных, не оставляющих сомнений в том, что нуклеиновые кислоты и белки играют исключительную роль в процессах обучения и формирования долговременной памяти. Это следует из того, что доказано: 1) выработка и закрепление условных рефлексов сопровождаются закономерными изменениями метаболизма нуклеиновых кислот и белков и 2) нарочитые изменения их метаболизма ведут к изменениям выработки и, особенно, закрепления временных связей. Вместе с тем выяснилось, что общее положение о ключевой роли этих макромолекул в процессах обучения и памяти требует конкретизации в различных аспектах. Прежде всего, потому, что важную роль в сохранении сформированных модификаций играет экспрессия генов.

Диссертационная работа П. Д. Лисачева посвящена актуальной проблеме современной нейробиологии: исследованию закономерностей участия генетического аппарата в механизмах нейрональной пластичности. Современные представления о механизмах обучения и памяти основываются на представлении о пластических свойствах нервных клеток и синаптической передачи. Традиционно считается, что в основе таких явлений лежит модификация силы синапса, обусловленная морфологическими и биохимическими изменениями. Долговременные изменения эффективности синаптической передачи являются ключевым физиологическим механизмом этих процессов. Долговременная потенциация (ДВП) является наиболее исследуемой формой пластичности, связанной с изменением синаптической эффективности. Важную роль в развитии ДВП играют активность модуляторных гетеросинаптических входов и внесинаптические (гуморальные) факторы нейронного и глиального происхождения, такие как BDNF, цитокины или белок S100B.

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций.

Впервые продемонстрировано увеличение экспрессии гена, кодирующего специфичный для глиальных клеток белок S100B, после индукции долговременной потенциации в поле CA1 гиппокампа. Автором 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 Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых протеинкиназ.

Впервые доказано участие транскрипционного фактора p53 в регуляции генов при формировании ДВП. Обнаружено, что индукция ДВП в гиппокампе сопровождается временным увеличением связывания транскрипционного фактора p53 с промотором гена S100B, что и является одной из причин изменения его экспрессии. Выявлено снижение количества белка p53 при формировании ДВП и показана ключевая роль Mdm2 и Sirt1 в этом феномене. 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 Bax и уменьшается экспрессия антиапоптозного белка Bcl2. В результате выполненных исследований диссертант пришел к заключению, что при формировании долговременной потенциации синаптической передачи генетический аппарат астроцитов оказывается вовлеченным в механизм нейроглиального взаимодействия, отвечающего за тонкую настройку синаптических связей.

Автором сделано 9 выводов, полностью соответствующих поставленным задачам и основанных на статистически достоверном материале. Диссертант хорошо владеет методами 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 11 работ в престижных рецензируемых журналах, в которых полно отражены основные результаты исследований. Могу добавить, что у него имеются

также другие статьи, выполненные по исследованиям, которые не вошли в тему диссертационной работы.

Научно-практическая ценность.

Полученные данные расширяют понимание клеточных механизмов пластичности. 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. Кроме того, результаты работы открывают новое перспективное направление в исследовании молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности, связанное с изучением путей активации и роли p53 в нейропластичности, расширяют потенциальную информативность модели ДВП в срезах гиппокампа при анализе действия биологически активных веществ.

Оценка объема, структуры и содержания работы.

Диссертация построена по классической схеме, включает введение, обзор литературы, описание объекта и методов исследования, результаты исследования, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы и список литературы. Диссертация написана на 200 страницах, иллюстрирована 26 рисунками и 8 таблицами. Список цитированной литературы включает 446 работ, из них 30 - отечественных авторов. Объем рукописи представляется оптимальным. Автореферат полностью отражает основные результаты, описанные в диссертации, и их обсуждение.

В разделе «Введение» отражены актуальность и значимость исследования, обосновывается выбор темы исследования, корректно сформулированы цель и задачи, научная новизна и практическая значимость работы. Обзор литературы состоит из нескольких частей. В первой части рассмотрены синаптическая пластичность, роль глии в этих процессах и охарактеризована долговременная потенция, как наиболее исследуемая форма пластичности, связанная с изменением синаптической эффективности. Во второй части обзора проведен анализ сигнальных путей между клеточной мембраной и ядром, рассмотрены гены, регулируемые нейрональной активностью. В заключительной части обзора подробно анализируются белки S100 (S100A1 и S100B), а также вероятные пути

регуляции транскрипционного фактора p53 при формировании долговременной потенциации. Хотел бы со своей стороны отметить, что со времени открытия в 1969 году белка S100 (B. Moore) были проведены многочисленные исследования, посвященные его роли в функционировании организмов. Это связано с тем, что сначала эти белки признаны нервноспецифическими, поэтому были очень интригующими; затем было показано, что их количество увеличивается при обучении, продемонстрирована их преимущественная локализация в глии. Всплеск интереса был также связан с обнаружением Ca-связывающих функций семейства, особенно для S100A1 и S100B. Однако позже после обнаружения большого количества представителей этого семейства, которые локализованы в разных тканях, интерес к этим белкам ослаб. Новый всплеск интереса связан с исследованиями экспрессии генов, кодирующих эти белки и транскрипционных факторов, регулирующие активность S100.

Эксперименты были выполнены на срезах гиппокампа, полученных от крыс Wistar (возраст 1,5-3 мес). При электрофизиологической регистрации определяли амплитуду популяционного спайка (п-спайка), вызванного стимуляцией коллатералей Шаффера. Интенсивность тестирующего/тетанизирующего стимула подбирали таким образом, чтобы амплитуда п-спайка в ответе составляла ~50% максимальной. Тетанизацию (4 серии стимулов (100 Гц, 1 с) с интервалом 30 с) или низкочастотную стимуляцию [НС] начинали через 2,5-3,5 ч после приготовления срезов. Исследовали влияние тетанизации на экспрессию S100B в нормальных условиях, а также с применением ингибиторов сигнальных молекул. Были изучены эффекты ингибитора убиквитинлигазы Mdm2 nutlin-3 (20 мкМ), ингибитора кальмодулинкиназ KN-93 (5 мкМ) и его неактивного аналога KN-92 (5 мкМ), ингибитора протеинкиназ K-252a (10-200 нМ), ингибиторов MAPK киназы MEK1 (PD 98059, 40 мкМ), MAP киназы p38 (SB 202190, 1 мкМ), RSK (BRD7389, 10 мкМ), протеинкиназ C и RSK2 (bisindolylmaleimide I, 100 нМ), деацетилазы Sirt1 (EH-527, 1 мкМ), ингибитора p53-зависимой транскрипции (cyclic pifithrin- α , 5 мкМ), блокатора глутаматных рецепторов NMDA-типа (MK-801, 10 мкМ). В биохимических экспериментах использовали метод ПЦР в реальном времени, вестерн блот, хроматиновую иммунопреципитацию.

В начальной серии экспериментов было найдено, что тетанизация коллатералей Шаффера достоверно увеличивала содержание мРНК как S100B, так и S100A1 в поле CA1, по сравнению с контрольными интактными срезами, находившимися в той же камере, что и стимулированные срезы. Однако динамика индуцированной тетанизацией экспрессии S100B и S100A1 оказалась разной, что отразилось в отличиях во временной динамике. Уже через 30 мин после тетанизации в образцах наблюдалось значительное увеличение уровня мРНК S100B до $286 \pm 27\%$ относительно контрольных (нестимулированных) срезов, затем ее уровень постепенно снижался и через 120 мин после тетанизации мало отличался от контроля. Содержание мРНК S100A1, напротив, медленно нарастало в течение первого часа и оставалось на достигнутом уровне в течение следующего часа после тетанизации (30 мин, $138 \pm 30\%$, 120 мин, $179 \pm 1\%$). Низкочастотная стимуляция не изменяла уровень мРНК S100B и S100A1, по сравнению с интактным контролем. Таким образом, диссертанту удалось получить модель ассоциированного с нейропластичностью изменения экспрессии генов S100.

Для подтверждения функциональности изменений содержания мРНК S100B было оценено количество белка S100B с поле CA1 после тетанизации с помощью Вестерн блот анализа. Найдено, что содержание белка S100B в срезах значительно увеличивалось через 20 мин после тетанизации и оставалось повышенным до 240-й минуты. Максимум уровня белка S100B приходился на 40-ую мин после тетанизации, то есть был сдвинут относительно максимума мРНК на 10-20 мин. Это показывает, что ключевые регуляторные события, определяющие динамику экспрессии S100B при формировании ДВП, приходится на первые 40 мин после стимуляции.

В следующей серии экспериментов диссертант попытался оценить возможный вклад в индукцию экспрессии генов S100 транскрипционного фактора Egr1 и комплекса AP-1, роль которых в синаптической пластичности и обучении интенсивно изучается. Это связано с тем, что в гене S100A1 крысы идентифицирована вероятная AP-1-связывающая последовательность, а в промоторе S100B крысы обнаружены вероятные сайты связывания Egr1. Изучали динамику экспрессии ранних генов в интервале 30-120 мин после индукции ДВП. Было показано, что содержание мРНК транскрипционных факторов ранней

экспрессии *Egr1*, *JunB* и *Jun* постепенно нарастало после тетанизации. Однако увеличение уровня мРНК *Jun* на ранних стадиях было небольшим, тогда как относительное количество мРНК *Egr1* и *JunB* значительно увеличивалась уже через 30 мин после тетанизации. Содержание мРНК *Fos* было достоверно выше контроля через 30 мин после тетанизации, затем возвращалось к исходному уровню (через 60 мин после тетанизации), а на 120-й минуте вновь наблюдалась тенденция к увеличению.

Большая серия экспериментов была посвящена изучению участия транскрипционного фактора p53 в регуляции S100B при формировании ДВП. Анализ нуклеотидной последовательности промотора гена S100B крысы показал наличие вероятных p53-респонсивных элементов (p53-PE), обладающих неполным соответствием канонической структуре сайта связывания p53. Поэтому было проведено исследование ДНК-связывающей активности p53 в CA1 срезах гиппокампа при ДВП с помощью метода хроматиновой иммунопреципитации. Было найдено увеличение способности p53 связываться с промотором гена S100B именно в том временном интервале, причем с той же динамикой, что и для уровня мРНК S100B. Причем увеличение ДНК-связанной фракции p53 не было вызвано ростом общего количества белка p53, что указывает на активацию p53 за счет посттрансляционных модификаций. Диссертантом показано участие p53 в регуляции транскрипции при индукции ДВП: связывание p53 с промотором гена S100B является одним из факторов, определяющих динамику мРНК S100B в ранней фазе потенциации. Активация p53 при ДВП носит кратковременный характер и сопровождается уменьшением количества белка p53. Тандем Sirt1/Mdm2 играет ключевую роль в деградации p53 при ДВП. Отсутствие влияния пифитрина-β на уровень мРНК S100B в нететанизированных срезах свидетельствует о том, что p53 не вносит вклада в регуляцию базальной экспрессии S100B, что, по-видимому, связано с его эффективным ингибированием со стороны Sirt1 и Mdm2 в отсутствие дополнительной активации, происходящей при индукции ДВП. Результаты экспериментов с пифитрином-β, EX-527 и нутлином-3 подтверждают, что экспрессия гена S100B крысы регулируется транскрипционным фактором p53. При этом в состоянии покоя p53 неактивен и не участвует в поддержании базального уровня транскрипции S100B.

Далее был изучен вклад в экспрессию S100B других факторов. Найдено, что зависимость от нейронной активности экспрессия S100B контролируется глутаматными рецепторами NMDA-типа, Ca^{2+} /кальмодулин-зависимыми протеинкиназами, протеинкиназами RSK и MAPK p38 и не зависит от активности MAP/ERK-киназного каскада. Базальный уровень мРНК S100B ограничивается деацетилазой Sirt1 и убиквитинлигазой Mdm2. В заключение П. Д. Лисачев делает вывод, что совокупность полученных данных позволяет заключить, что при формировании долговременной потенциации синаптической передачи генетический аппарат астроцитов оказывается вовлеченным в механизм нейроглиального взаимодействия, отвечающего за тонкую настройку синаптических связей.

Работа построена логично, выполненные автором эксперименты соответствуют высокому уровню докторской диссертации. Диссертация охватывает широкий круг проблем, поэтому при ее чтении возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Стр. 18. Усиление синаптической силы не обязательно связано с ростом размеров синапсов.
2. Стр. 34. Низкая специфичность антител к S100 (Rebaudo et al., 2000) – откуда такая уверенность?
3. Вопрос (Стр. 35): Чем отличаются моноклональные антитела к S100 от полиспецифичных в смысле чувствительности (специфичности)?
4. Стр. 38. Внутрижелудочковое введение S100B стимулирует нейрогенез, а с другой стороны тест на S100B является показателем патологических процессов в мозге. Нет ли здесь противоречия?
5. Стр. 41. Секретия S100B от глутамата – понятно, а от рецепторов 5-HT_{1A} - нет.
6. Стр. 61. 2 способа хранения материала (помещение в жидкий азот и консервация в протекторном реагенте). Какой лучше?
7. Стр. 80. Каковы механизмы быстрого увеличения мРНК S100B уже через 10 мин после тетанизации, а максимум – через 20-30 мин?

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

Заключение

Таким образом, диссертация Павла Дмитриевича Лисачева на тему: “Нейропластичность и экспрессия генов (нейро-глиальное взаимодействие и формирование долговременной потенциации синаптической передачи)”, 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, их теоретическая значимость дают основание считать, что диссертация является целостным и законченным научно-квалификационным исследованием, соответствующим требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г., № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор – Павел Дмитриевич Лисачев заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент:

Гайнутдинов Халил Латыпович, доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник OpenLab «Нейробиология», профессор кафедры физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Почтовый адрес: 420008 Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18. Тел. 8(843)2319077. E-mail: kh_gainutdinov@mail.ru



Х.Л. Гайнутдинов

