

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Лисачева Павла Дмитриевича

«Нейропластичность и экспрессия генов (нейро-глиальное взаимодействие и формирование долговременной потенциации синаптической передачи)», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

**Актуальность темы диссертации.** Исследование Павла Дмитриевича Лисачева является важным вкладом в реконструкцию исключительно сложной картины молекулярных процессов, связанных с синаптической пластичностью. В качестве модели нейропластичности автором выбрана длительная потенциация (ДП) в гиппокампе. Следует отметить, что зависящая от рецепторов NMDA-типа ДП остается наиболее приемлемым кандидатом на роль нейронного механизма обучения. В соответствии с временным ходом формирования (консолидации) поведенческой памяти от кратковременной к долговременной при выработке условных рефлексов, ДП проходит в своем развитии две фазы – раннюю, не зависящую от белкового синтеза и связанную с конформационными изменениями предсуществующих белков, и позднюю, связанную с синтезом нового белка. Поэтому анализ генной экспрессии при формировании ДП является актуальным и бурно развивающимся направлением нейробиологии.

В центре внимания автора – связь длительной потенциации с экспрессией специфичного для глии гена S100B. В течение многих десятилетий после их открытия глиальные клетки рассматривались как некая функционально инертная субстанция для заполнения пространства между нейронами. В настоящее время ясно, что глия осуществляет чрезвычайно важные и разнообразные функции в обеспечении развития, жизни и коммуникации нейронов. Глия непосредственно участвует в контроле нейронной активности и синаптической передачи. Имеющаяся информация указывает на то, что белок S100B также вовлечен в этот процесс. Поэтому

представленные в диссертации результаты представляют существенный интерес для понимания механизмов нейроглиального взаимодействия на уровне генной экспрессии в контексте нейропластичности. Важно подчеркнуть, что значимость изучения регуляции экспрессии S100B связана не только с его участием в нейропластичности, но и с вовлечением этого белка в патологические процессы.

**Новизна, достоверность и степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Результаты проведенных исследований позволили автору сформулировать вполне обоснованные положения и выводы. П.Д. Лисачевым впервые получена модель зависящего от нейронной активности увеличения экспрессии генов S100B и S100A1 в условиях *in vitro*, после индукции ДП в срезах гиппокампа. Использование большого набора ингибиторов сигнальных молекул позволило значительно продвинуться в понимании механизмов регуляции экспрессии S100B. Продемонстрирована, в частности, ключевая роль  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимых протеинкиназ в увеличении экспрессии S100B при формировании ДП.

В ходе исследования впервые была показана активация транскрипционного фактора p53 после индукции ДП, что и является одной из причин увеличения экспрессии S100B. Используя активатор p53 нутлин-3, автор идентифицировал еще ряд генов, экспрессия которых изменяется при ДП, предположительно, с участием p53. В частности, впервые обнаружено увеличение экспрессии гена проапоптозного белка Bax и уменьшение экспрессии антиапоптозного белка Bcl2 в ранней фазе ДП.

Также впервые выявлено снижение количества белка p53 при формировании ДП и показана ключевая роль убиквитинлигазы Mdm2 и деацетилазы Sirt1 в этом феномене.

На основании анализа полученных результатов и данных литературы автор сформулировал гипотезу, согласно которой к вероятным функциям активации p53 и изменения экспрессии его мишеней, в частности, S100B при

формировании ДП могут быть отнесены трофическая поддержка клеток мозга в условиях повышенной функциональной нагрузки и гомеостатическое ограничение роста эффективности возбуждающих синапсов, необходимое для стабильного функционирования мозга.

Использованные методики (электрофизиологические, ПЦР в реальном времени, Вестерн блот анализ, хроматиновая иммунопреципитация) современные, статистическая обработка проведена корректно. Основные научные результаты диссертации опубликованы в 11-ти рецензируемых научных журналах, соответствующих требованиям, установленным для научных изданий, в которых должны быть опубликованы результаты диссертаций. Кроме того, по теме диссертации опубликовано 2 статьи и 8 тезисов докладов в материалах конференций. Содержание диссертации соответствует указанной специальности.

#### **Замечания и вопросы:**

1) Несмотря на то, что индукция ДП в срезах гиппокампа вызывает тот же эффект, что и обучение крыс, а именно, – увеличение экспрессии S100B, механизмы этого явления могут отличаться в разных условиях. Поэтому, хотя представленные в диссертации данные, несомненно, представляют существенный интерес, в полной мере их значимость может быть оценена только после подтверждения универсальности обнаруженных закономерностей для условий *in vivo*.

2) Существует большое разнообразие протоколов индукции ДП. Случаен ли сделанный автором выбор протокола?

3) В заключительной части исследования автор делает попытку оценить роль р53-зависимой экспрессии генов в синаптической пластичности, исследуя влияние ингибитора р53 пифитрина-β на динамику ДП. Принимая во внимание предположение, что эта роль заключается в ограничении роста синаптической эффективности, выбранный протокол индукции ДП представляется не вполне удачным для данного эксперимента. Если гипотеза верна, ингибирование р53 должно было усилить ДП, однако

использованная в работе интенсивная стимуляция, скорее всего, вызывает "насыщенную" потенциацию, дальнейшее усиление которой представляется маловероятным. Поэтому неэффективность пифитрина- $\beta$  в этом эксперименте выглядит вполне закономерной. На будущее хочется порекомендовать автору для подобных оценок использовать протоколы стимуляции, приводящие к формированию более слабой потенциации.

4) В некоторых работах сообщается, что потенциацию удается вызвать не во всех срезах, взятых от одного и того же животного. В диссертации эта тема не затрагивается. Вопрос представляется важным, поскольку проведение биохимических анализов на ранних этапах ДП не дает возможности проверить длительность ее сохранения. Сталкивался ли автор с проблемой нестабильности индукции ДП в контрольных экспериментах?

**Оформление диссертации** соответствует принятым стандартам. Диссертация объемом 200 страниц состоит из титульного листа, оглавления, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, собственных результатов, обсуждения, заключения и выводов, списков сокращений и цитированной литературы. Работа в достаточной мере проиллюстрирована таблицами и рисунками (8 таблиц и 26 рисунков). Библиографический список включает 446 источников. Цитирования выполнены корректно. Литературные сведения достаточно полно отражают актуальность и степень разработанности поставленной проблемы. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

На основании вышеизложенного считаю, что диссертация Павла Дмитриевича Лисачева «Нейропластичность и экспрессия генов (нейроглиальное взаимодействие и формирование долговременной потенциации синаптической передачи)» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой на основании выполненных автором исследований выявлены важные новые закономерности регуляции генов при

формировании длительной потенции синаптических связей. Совокупность разработанных теоретических положений можно квалифицировать как научное достижение. Работа соответствует критериям, установленным для диссертаций на соискание ученой степени доктора наук «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а соискатель заслуживает ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент,  
Владимир Георгиевич Скребицкий,  
член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор,  
руководитель лаборатории функциональной  
синаптологии ФГБНУ "Научный центр неврологии".  
Почтовый адрес: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80.  
Телефон: +7-495-9178007  
Электронный адрес: skrebitsky@yahoo.com



(В.Г. Скребицкий)

Подпись руки профессора В.Г.Скребицкого заверяю.

Ученый секретарь ФГБНУ "Научный центр неврологии", к.м.н.



(А.Н. Евдокименко)

