

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Баль Натальи Вячеславовны

**«Роль оксида азота в синаптической пластичности и деградации белков
в нейронах»**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.03.01 – «Физиология»

Актуальность диссертационной работы

Оксид азота синтезируется в нашем организме, в том числе в мозге, и необходим для осуществления многих функций; в частности, имеются экспериментальные свидетельства участия оксида азота в процессах обучения и памяти. Кроме того, получены факты, указывающие, что процессы с участием оксида азота вовлечены в развитие неврологических и нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на значительные успехи нейронауки в исследовании механизмов познавательной деятельности мозга, в этой области знаний пока остается множество вопросов, которые еще ждут своего разрешения. Таким вопросом, в частности, является выяснение роли оксида азота в когнитивных функциях. В литературе имеются противоречивые сведения о роли данной газообразной молекулы в этих функциях. С одной стороны, получены факты, свидетельствующие о том, что оксид азота участвует в регуляции синтеза белка *de novo*, что необходимо для обучения, с другой, – что эта сигнальная молекула участвует также в процессе, который выполняет противоположную синтезу белка функцию. Для разрешения этой проблемы необходимо, в частности, выяснение роли оксида азота в долговременной потенциации (ДВП), – явлении, отражающем пластические изменения в синапсах при обучении. Относительно этого вопроса в литературе также имеются противоречивые данные. Отсюда понятна актуальность диссертационной работы, где проведено детальное исследование роли оксида азота в распаде белков в нейронах и синаптической пластичности.

Основные научные результаты, их новизна

Диссертационная работа Н.В. Баль посвящена изучению роли оксида азота в различных нейрофизиологических процессах. Исследование проведено при использовании нескольких экспериментальных подходов. Основная часть

проделана на нейроглиальной культуре гиппокампа. В опытах использован вирус, содержащий зеленый флуоресцентный белок, сшитый с убиквитином, и плаزمид, содержащая Ub^{G76V}-GFP. Для достижения поставленной цели автор использовал глубокое секвенирование культуры нейронов гиппокампа, вестерн-блоттинг, иммуноцитохимический анализ, а также биоинформатический анализ данных. Для записи флуоресцентных изображений использовался конфокальный и эпифлуоресцентный микроскопы. С целью выяснения роли оксида азота в ДВП проведены электрофизиологические эксперименты на срезах гиппокампа. Таким образом, методический уровень диссертационной работы Н.В. Баль очень высок; он не уступает мировому уровню работ подобного плана. Несмотря на то, что в работе накоплен очень большой объем данных, полученных многими методами, автор участвовал практически во всех экспериментах, а также анализе полученных результатов.

В проведенных опытах получены данные, свидетельствующие о высокой экспрессии нейрональной NO-синтазы в культуре нейронов гиппокампа. В настоящей работе показано, что блокада синтеза оксида азота снижает скорость деградации репортерного белка, конъюгированного с убиквитином. Это свидетельствует о том, что синтез оксида азота регулирует убиквитин-зависимый распад белков. Это открытие позволяет по-новому взглянуть на механизмы регуляции белкового состава в нейронных отростках и их морфофункционального строения. Важно, что автором специально исследована деградация белков в отростках нейронов, а не в их телах, поскольку распад белков характеризуется точным пространственно-временным паттерном; при этом процессы, идущие в дендритах и аксонах, играют основную роль в синаптической пластичности, также изучаемой автором в данном аспекте.

Полученные Н.В. Баль результаты указывают на то, что оксид азота участвует в регуляции убиквитин-зависимого распада белков в протеасомах, являясь начальным сигналом для этого процесса.

В экспериментах по изучению долговременной потенциации впервые обнаружено, что блокада синтеза оксида азота нарушает ДВП, в то время как одновременная блокада синтеза оксида азота и синтеза белка предотвращает это нарушение. На основании этих и других данных автор предполагает, что оксид азота, синтезируемый нейрональной NO-синтазой, вместе с синтезом и

деградацией белков контролирует белковый баланс, который в свою очередь определяет структурно-функциональную организацию синапсов.

Исследование роли оксида азота как начального сигнала для распада белков было продолжено в экспериментах с реконсолидацией памяти. Известно, что вопрос о механизмах дестабилизации памяти при напоминании является малоизученным; не вполне понятна роль этого процесса в общих механизмах памяти. В данной работе, в поведенческих экспериментах на модели условно-рефлекторного замирания на звук у крыс впервые обнаружено, что блокада NO-синтазы предотвращает амнестический эффект блокады синтеза белка, вызванный циклогексимидом. Сходный эффект ранее был показан на беспозвоночных; в настоящей работе впервые продемонстрировано аналогичное действие оксида азота на млекопитающих. В работе удалось показать роль оксида азота в качестве агента, включающего процесс дестабилизации памяти во время напоминания у крыс. Выявлено также, что в условиях, когда новая память не может быть сформирована из-за блокады синтеза белка, старая память сохраняется после напоминания только при нарушении синтеза оксида азота. Эти факты очень важны для понимания механизмов долговременной памяти.

Значимость для науки и практики

В настоящей работе получены новые данные о роли оксида азота в работе нервной системы; они вносят существенный вклад в понимание механизмов участия этой сигнальной молекулы в физиологических процессах в нейронах в норме и патологии. Полученные результаты могут помочь объяснить противоречия в полученных ранее данных о роли оксида азота в синаптической пластичности и памяти, поскольку показывают, что оксид азота может одновременно участвовать в разнонаправленных процессах, и разница в балансе между ними может играть решающую роль в конечном результате происходящих изменений в нервной системе.

Практическая значимость данной работы также обусловлена участием оксида азота в развитии некоторых заболеваний. Нарушение работы NO-синтазы в мозге связано с возникновением таких патологий, как болезнь Альцгеймера, инсульт и болезнь Паркинсона. Полученные в диссертационной работе факты могут

способствовать большему пониманию механизмов участия оксида азота в развитии нейродегенеративных заболеваний и созданию новых подходов для их терапии.

Данные, полученные в работе, могут быть использованы при чтении лекций в средних специальных (медицинских) и высших учебных заведениях, а также при разработке новых подходов при терапии нейродегенеративных заболеваний. Работу следует продолжить в Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН и лабораториях ведущих научных центров России.

Общие замечания

Серьезных недостатков в диссертационной работе не обнаружено, однако есть некоторые замечания и комментарии.

Диссертация написана очень компактно. С одной стороны, это положительная характеристика работы; однако главы литературный обзор и обсуждение, хотя и рассматривают все необходимые вопросы, тем не менее, в некоторых аспектах требуют более подробного изложения материала. В частности, не описаны в явной форме свойства оксида азота как ретроградного передатчика, в том числе, в осуществлении процесса долговременной потенциации в гиппокампе. В то же время предполагается, что за счет этого свойства оксид азота играет важную роль в осуществлении NMDA-рецептор независимой ДВП в системе связи CA3-CA1 (Pigott, Garthwaite, 2016).

Автор упоминает, что нарушение работы NO-синтазы вовлечено в развитие некоторых нейропатологий. Желательно было бы кратко описать двойственную роль оксида азота при нейропатологиях, когда он может быть как нейропротектором, так и стимулятором развития болезни, в зависимости от ее стадии (Chakroborty et al., 2015), связав это с полученными в диссертации результатами. Это могло бы повысить значимость работы и дать дополнительный толчок к проведению соответствующих исследований на моделях нейропатологий.

В диссертации встречаются стилистические погрешности. В списке литературы ссылки на зарубежных авторов сопровождаются добавлением «и др.», что не корректно (правильно писать «et al.»).

Однако указанные замечания не снижают ценности проведенной работы.

Заключение

Диссертация представляет собой законченную научно-исследовательскую работу на актуальную тему. Литературный обзор и Обсуждение включают необходимые сведения, касающиеся работы, и дают достаточный сравнительный анализ полученных результатов. Показанное в настоящей работе влияние усиления синтеза оксида азота на убиквитин-зависимый распад белков позволяет по-новому взглянуть на механизмы регуляции белкового состава в отростках нейронов и их морфофункционального строения.

Выводы достаточно обоснованы.

Работа соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата наук по специальности 03.03.01 – «Физиология».

Зав. лаб. Системной организации нейронов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН,

д.б.н., специальность 03.00.13 – «Физиология человека и животных»

Подпись В.Ф. Кичигиной удостоверяю



В.Ф. Кичигина

/В.Ф. Кичигина/

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук. 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 3, ИТЭБ РАН.