

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук



Д.б.н.

/Фирсов М.Л./

«28» апреля 2017 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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

Интерес к долговременной синаптической пластичности – феномену, экспериментально подтвержденному в 70-е годы прошлого века, - не ослабевает уже несколько десятилетий. Это связано с тем, что синаптическая пластичность обнаружена у всех организмов, обладающих нервной системой и способных хотя бы ненадолго чему-либо научиться. Долговременная синаптическая пластичность лежит в основе памяти и обучения, ее нарушения приводят к серьезным повреждениям когнитивных способностей, что и наблюдаются при целом ряде нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на многочисленные экспериментальные исследования, многие вопросы регуляции синаптической пластичности остаются невыясненными, полученные данные часто противоречивы, поэтому доскональное изучение механизмов синаптической пластичности остается актуальной задачей современной нейробиологии. Целью данной работы является исследование роли оксида азота в синаптической пластичности и распаде белков в нейронах. Современные исследования показывают, что оксид азота участвует в регуляции синтеза белка во время обучения; при этом весьма вероятно, что оксид азота вовлечен в различные механизмы синаптической пластичности, возможно, действующие

разнонаправленно, поэтому требуется углубленное и всестороннее изучение этого вопроса.

Структура диссертации и степень полноты изложения материала

Диссертация изложена на 111 страницах, включает 2 таблицы и 15 рисунков. Работа состоит из введения, трех глав литературного обзора, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы включает 205 источников, в том числе 11 отечественных и 194 зарубежных.

Автор достаточно подробно и глубоко анализирует современную литературу по изучаемой проблеме. Следует подчеркнуть, что Наталья Вячеславовна не просто перечисляет экспериментальные факты по теме своего исследования, а проводит их критический анализ, выявляет противоречия между опубликованными данными, предлагает возможные гипотезы для объяснения этого. Поэтому каждая из трех поставленных задач диссертационной работы является обоснованной. Эти задачи логично вытекают из анализа текущих научных представлений и служат для достижения поставленной диссертантом цели. Одна из частей литературного обзора о протеасомах и убиквитин-зависимом распаде белков лежит в основе статьи «Убиквитин-зависимый распад белков необходим для долговременной пластичности и памяти», Баль Н.В., Балабан П.М. // Нейрохимия. 2015. Т. 32. № 4. С. 275-284 (Баль, Балабан, 2015).

Методы исследования изложены подробно, содержат все необходимые детали для воспроизведения. Несомненным достоинством работы является комплексный подход к изучаемому предмету, наряду с классическими электрофизиологическими методами – регистрация и индукция долговременной синаптической пластичности в срезах, автор использует методы молекулярной биологии и биохимии (электрофорез, вестерн-блоттинг, сбор мРНК для секвенирования). Диссертантом освоены методы культивирования нейронов гиппокампа и трансдукции их вирусом, в составе группы проведены поведенческие эксперименты. В работе используется конфокальная микроскопия и иммуногистохимия. Все представленные методы использованы обоснованно и направлены на однозначное решение поставленных в работе задач.

Результаты исследования в целом хорошо документированы, все основные данные проиллюстрированы. Полученные результаты грамотно обработаны и проанализированы статистически, изложены четко и логично, обсуждаются по ходу изложения материала. В разделе «Обсуждение» автором на основе собственных результатов и данных, полученных ранее другими исследователями, предложена оригинальная модель молекулярных событий, вызывающих дестабилизацию памяти во время реактивации (диссертационная работа, рис. 15). Автор делает обоснованное предположение о том, что дестабилизация памяти и потенцированной синаптической передачи под действием оксида азота не связана с каскадом гуанилатциклаза-цГМФ-протеинкиназа G, а определяется путем нитрозилирования белков-мишеней.

Заключение и выводы тщательно сформулированы, конкретны, целиком основаны на собственных результатах, являются основой новых представлений о механизмах вовлеченности оксида азота в синаптическую пластичность.

Автореферат диссертационной работы полностью отражает структуру и основные результаты диссертации.

Научная новизна, обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Степень научной новизны диссертации высокая. Следует отметить следующие основные находки автора:

- 1) оксид азота вовлечен в регуляцию убиквитин-зависимого распада белков в нейронах, что было показано при использовании генетически-кодируемого флуоресцентного сенсора UbG76V-GFP на культуре нейронов показано;
- 2) синтез NO необходим для поддержания долговременной синаптической потенциации в срезах гиппокампа, блокада синтеза оксида азота нарушает позднюю фазу долговременной потенциации. При этом одновременная блокада NO-синтазы и синтеза белка не изменяет долговременную потенциацию в срезах гиппокампа;
- 3) блокада NO-синтазы предотвращает амнестический эффект блокады синтеза белка в экспериментах с реконсолидацией в модели условно-рефлекторного замирания на звук у крыс.

В целом, полученные автором диссертации собственные данные являются убедительными, приоритетными, несут фундаментальный характер, расширяют современные представления о механизмах долговременной синаптической пластичности.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации обеспечена профессиональным анализом литературы, умением формулировать цели и задачи исследований, мультидисциплинарным подходом с использованием комплекса взаимодополняющих современных методов исследований, а также адекватной статистической обработкой данных.

Результаты и основные положения были апробированы на нескольких конференциях, в том числе на 9-м Форуме европейских обществ нейробиологии (Милан, 2014), Зимней конференции по нейробиологии (Зольден, Австрия, 2014). Результаты диссертации прошли квалифицированную внешнюю экспертизу и были опубликованы в ведущих международных (*Cellular and Molecular Neurobiology* и *European Journal of Neuroscience*) и отечественных (Нейрохимия) журналах. Это также подтверждает научную новизну и значимость полученных результатов.

Значимость для науки

Представленные в диссертации данные фундаментального характера вносят существенный вклад в изучение механизмов синаптической пластичности в ЦНС млекопитающих. Проведенное комплексное исследование существенно расширило знания в отношении молекулярных механизмов регуляции и понимание участия оксида азота в физиологических процессах в нейронах. Предложена схема молекулярных процессов, происходящих во время реактивации памяти, с учетом новых экспериментальных данных об участии оксида азота в реконсолидации памяти, что улучшает теоретическое понимание процесса дестабилизации памяти при напоминании.

Практическое значение

На основе полученных автором результатов, свидетельствующих о вовлеченности оксида азота в процесс убиквитин-зависимого распада белков в нейронах и регуляцию и поддержание долговременной синаптической

потенциации, в перспективе представляется возможным разработать новые терапевтические подходы для коррекции патофизиологических состояний, наблюдаемых при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера. Новые данные об участии оксида азота в реконсолидации памяти могут быть использованы при поиске новых мишеней для лечения расстройств поведения, связанных с употреблением психоактивных веществ.

Предложения 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 эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН и Институт мозга человека РАН в Санкт-Петербурге, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН и Институт медико-биологических проблем РАН в Москве. Полученные факты могут быть использованы при экспериментальном моделировании различных заболеваний, при которых наблюдается нарушения синаптической пластичности.

Замечания и вопросы по работе

1. Иммуноцитохимия. С какой целью проводилось последовательное окрашивание антителами на nNOS и MAP2, почему нельзя было это сделать одновременно?

2. Электрофизиологические эксперименты. С какой целью использовалась повышенная концентрация глюкозы в перфузирующем растворе (25 мМ при типично используемом диапазоне 10-15 мМ)? Скорости перфузии 3 мл/мин при стандартных объемах ванночки обычно недостаточно для получения стабильной долговременной потенциации. Какая скорость обмена жидкости поддерживалась в эксперименте? С чем связан выбор такого усиленного протокола стимуляции для индукции долговременной потенциации (увеличение в два раза амплитуды тока, использование большого числа пачек и

повторностей)? Чем автор объясняет уменьшение величины синаптической потенциации в ходе опыта в контрольных условиях (рис. 9)?

3. Некоторые рисунки в диссертации требуют доработки. Например, на морфологических рис. 2 и 4 отсутствует шкала масштаба; на рис. 5б - достоверность различий при приведенных стандартных ошибках вызывает сомнения, возможно там приведены доверительные интервалы или стандартные отклонения. На рис. 7 ответ показан частично, полностью отрезаны стимуляционный артефакт и fiber value, что затрудняет оценку качества экспериментальных записей. На рис. 9 нет шкал для приведенных примеров ответов, поэтому сложно оценить амплитуду и длительность ответов.

4. В обсуждении автор указывает на важную роль GluN2B-содержащих NMDA рецепторов в процессах дестабилизации памяти во время реактивации, предлагается гипотетическая схема молекулярных событий при этом (рис. 15). Какие эксперименты может предложить диссертант, чтобы однозначно подтвердить гипотезу о специфической роли GluN2B-содержащих NMDA рецепторов в этих процессах?

5. В автореферате, на стр. 6 используется термин «смешанная нейроглиальная культура», что неверно.

Заключение

Диссертационная работа Н.В. Баль «Роль оксида азота в синаптической пластичности и деградации белков в нейронах», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – Физиология, является научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенного комплексного экспериментального исследования содержится решение научной задачи о роли оксида азота в синаптической пластичности и распаде белков в нейронах. Полученные в работе данные имеют важное теоретическое и практическое значение для современной нейрофизиологии.

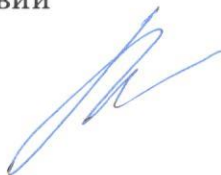
По объему выполненной работы, актуальности, научной новизне основных положений, целостности, законченности, практической значимости и публикациям диссертационная работа полностью соответствует критериям, изложенным в Разделе II «Положения о порядке присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор – Наталья Вячеславовна Баль заслуживает

присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 - Физиология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании лаборатории Молекулярных механизмов нейронных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук 24 апреля 2017 г., протокол № 11.

Отзыв составлен зав. лаб. Молекулярных механизмов межнейронных взаимодействий

д.б.н.



Зайцев А.В.

Сведения о составителе отзыва:

Зайцев Алексей Васильевич – доктор биологических наук по специальности 03.03.01 – Физиология, заведующий лабораторией Молекулярных механизмов межнейронных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Адрес: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44.

тел.: 8(812) 552-30-12;

e-mail: aleksey_zaitsev@mail.ru