

ОТЗЫВ ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Натальи Вячеславовны Баль « **РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ И ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ В НЕЙРОНАХ**» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности Физиология - 03.03.01.

Актуальность темы диссертации

В последние десятилетия большое внимание уделяется изучению роли оксида азота (NO) в качестве универсального трансммиттера в развитии различных патологических состояний. Известно, что окись азота синтезируется практически во у всех типов живых организмов, от бактерий до клеток животных. У млекопитающих NO вызывает расслабление гладко-мышечных клеток сосудов, участвует в фагоцитировании патогенов, является нейромедиатором, регулирует пролиферацию и программируемую гибель клеток, а также другие процессы. Существует три изоформы NO-синтазы в клетках млекопитающих – нейрональная (nNOS или NOS1), эндотелиальная (eNOS или NOS3) и индуцибельная (iNOS или NOS2). Нарушение работы NO-синтазы в мозге вовлечено в патогенез болезни Альцгеймера, инсульта, болезни Паркинсона и др. В нейронах центральной и периферической нервной системы экспрессируется нейрональная изоформа NO-синтазы Förstermann, Sessa, 2012). Активность nNOS зависит от многих факторов, в частности, от входящих в клетку ионов кальция. NO-синтаза часто заякорена с NMDA-рецепторами (Alderton, Cooper, Knowles, 2001; Valtchanoff, Weinberg, 2001), и поэтому входящие в клетку ионы кальция могут локально её активировать после связывания с белком кальмодулином. Из-за локального расположения и локальной активации нейронов синтезируемая молекула NO может быть задействована в тонких механизмах регуляции пластичности в нейронах. Особое внимание в этой связи следует уделить убиквитин-протеасомной системе, отвечающей за деградацию индивидуальных белков и обеспечивающей гомеостаз протеома клеток. Убиквитин-протеасомная система эукариот, в том числе клеток ЦНС млекопитающих, интенсивно изучается в связи с процессами пластичности. Данная работа посвящена выяснению роли NO в регуляции гомеостаза протеома нейронов гиппокампа и важна для понимания тонких механизмов синаптической пластичности ЦНС и возможностей использования модуляторов NO в медицинской практике для коррекции нарушений пластичности. Кроме того, в работе исследована роль NO в процессах реактивации памяти на модели условной реакции замирания у крыс.

Структура и содержание работы.

Диссертация Баль Н.В. состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 111 страницах текста, включает 2 таблицы и 15 рисунков. Список литературы включает 205 источников, в том числе 11 отечественных и 194 зарубежных. По результатам диссертации соискателем напечатаны статьи в журналах «Cellular and Molecular Neurobiology», «European Journal of Neuroscience» и

«Нейрохимия», входящих в Перечень ВАК. Материалы диссертационной работы Баль Натальи Вячеславовны были широко представлены на российских и международных конференциях. По материалам конференций напечатано 7 тезисов докладов.

Обзор литературы написан хорошо и подробно. Диссертантом описывается современное состояние проблемы. Подробно описаны основные метаболические пути, с помощью которых оксид азота осуществляет функции в организме млекопитающих: активация фермента гуанилатциклазы (ГЦ) и посттрансляционная модификация белков. Связывание оксида азота с гемовым центром ГЦ приводит к активации последней и синтезу циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), который, в свою очередь, активирует фермент протеинкиназу G (PKG), имеющей множество мишеней в клетке, в том числе кальциевые, калиевые каналы, а также некоторые транскрипционные факторы. В обзоре литературы также подробно рассмотрены вопросы о роли окиси азота и убиквитин-протеасомной системы в ЦНС. Соискателем отмечены аспекты взаимодействия молекул окиси азота и убиквитин-протеасомной системы, требующие исследования. Ознакомившись с обзором литературы, убеждаешься, что Баль Наталья Вячеславовна провела квалифицированный анализ современной литературы по разрабатываемой теме, и это позволило ей чётко поставить задачи, грамотно провести исследования и внести свой вклад в решение данной проблемы.

Материалы и методы.

Для выполнения поставленных задач Баль Н.В. был использован ряд современных методов исследований и различных подходов. Для характеристики нейрональной культуры эмбрионального гиппокампа крысы было использовано полупроводниковое секвенирование и биоинформатический анализ данных, Вестерн-блоттинг, иммуногистохимическое окрашивание, которые позволили выявить наличие преимущественно нейрональной NO-синтазы (отсутствие индуцибельной изоформы) в культуре, а также компонентов убиквитин-протеасомной системы. Регистрация процессов деградации убиквитина проводилась с помощью конфокальной микроскопии флуоресценции генетически-кодируемого флуоресцентного сенсора UbG76V-GFP в отростках нейронов, который вводился в культуру с помощью плазмиды, содержащей UbG76V-GFP. На культурах переживающих срезов гиппокампа взрослых крыс были проведены электрофизиологические исследования долговременной потенциации нейронов. В процессах реактивации памяти на модели условной реакции замирания у крыс была исследована роль окиси азота в реконсолидации памяти. Раздел Методов исследований написан подробно и хорошо. Обосновано использование выбранных статистических методов для анализа данных.

Результаты и обсуждение.

В этих разделах Наталья Вячеславовна подробно излагает результаты своих исследований и дает их детальный анализ. Многочисленные результаты изложены корректно с использованием таблиц и графиков, что облегчает их понимание. Достоверность и научная новизна полученных результатов не вызывает сомнений. Обсуждение результатов построено логично на основе собственных и литературных данных. Выводы соответствуют поставленным задачам исследования и логически вытекают из полученных результатов. В разделе «Обсуждение» настоящей работы соискателем предлагается схема молекулярных процессов, происходящих во время

реактивации памяти, с учетом новых экспериментальных данных об участии оксида азота в реконсолидации памяти.

Новизна исследования и полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации.

Диссертационная работа Баль Н. В. является законченным научным исследованием, выполненным на высоком теоретическом и практическом уровне. В работе впервые показано, что блокада NO-синтазы с помощью L-NAME (200мкМ) снижает скорость падения флуоресценции генетически-кодируемого флуоресцентного сенсора UbG76V-GFP в отростках нейронов, то есть ингибирует распад белков в протеасомах. Это, в свою очередь, также указывает на то, что оксид азота вовлечен в регуляцию убиквитин-зависимого распада белков в нейронах. Результаты секвенирования и последующей биоинформатической обработки показывают, что в культуре нейронов экспрессируются различные компоненты убиквитин-зависимого распада белков. В первую очередь, наблюдается высокая представленность мРНК гена убиквитина *Ubb*, и гораздо меньшая – гена *Ubc*. В настоящей работе впервые показано, что одновременная блокада NO-синтазы и синтеза белка не изменяет долговременную потенциацию в срезах гиппокампа, в то время как блокада только синтеза оксида азота нарушает позднюю фазу долговременной потенциации. В экспериментах по изучению реконсолидации памяти в модели условно-рефлекторного замирания на звук у крыс впервые обнаружено, что блокада NO-синтазы предотвращает амнестический эффект блокады синтеза белка с помощью циклогексимида. Сходный эффект ранее был показан только на беспозвоночных, в настоящей работе впервые продемонстрировано такое же действие оксида азота на млекопитающих.

Таким образом, полученные в настоящей работе данные вносят существенный вклад в теоретическое понимание вопроса участия оксида азота в физиологических процессах в нейронах.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.

Достоверность выводов подтверждается хорошо продуманной научной аргументацией. Баль Н.В. эффективно использует теоретические и методологические положения, существующие в современной научной литературе. Подтверждением основных тезисов служит полученный автором обширный фактический материал. Диссертант осуществил строгую статистическую проверку высказанных положений.

Принципиальные замечания к диссертационной работе Н.В. Баль отсутствуют. Однако, несмотря на общую положительную оценку работы, следует отметить некоторые замечания и пожелания:

1. В разделе «Результаты исследования» собственные данные обсуждаются с имеющимися в литературе данными по этому вопросу, что логично было бы отнести в раздел «Обсуждение».

2. Некоторые подписи рисунков не содержат полной научной информации о рисунке, это касается рисунков по иммуногистохимии и Вестерн-блоттингу. В рисунке по иммуногистохимическому окрашиванию культур клеток гиппокампа не указана шкала и отсутствует контроль флуоресценции вторичных антител. Кроличьи антитела к nNOS указаны как красные.

3. В результатах используется английские и русские сокращения для названия использованных соединений. Правильнее было бы сделать список сокращений и использовать одну из форм.

4. В поведенческих экспериментах использовались животные весом 210-370 г, это может указывать, отчасти, на их различный возраст. Следовало бы подробнее указать в разделе «Методы» каким образом животные были ранжированы по этому показателю.

5. В работе использован новый подход к характеристике нейрональной культуры клеток с помощью метода ионного полупроводникового секвенирования. Было бы замечательно, если бы в таблице с данными полупроводникового секвенирования фигурировали и альфа-субъединицы протеасом, а не только каталитические бета-субъединицы, которые дополнили бы данные об убиквитин-протеасомной системе в культуре нейронов эмбрионального гиппокампа. Это пожелание на будущее.

Ценность полученных автором диссертации результатов для науки и производства.

Обнаружено, что у млекопитающих, также как и у беспозвоночных блокада NO-синтазы предотвращает амнестический эффект блокады синтеза белка с помощью циклогексимида. Это указывает на консервативность молекулярных механизмов действия NO. Результаты проведенных Н.В. Баль исследований способствуют глубокому пониманию тонких механизмов участия оксида азота в физиологических процессах в норме и при патологиях.

Соответствие содержания автореферата содержанию диссертации.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.

Таким образом, диссертационная работа Баль Натальи Вячеславовны на тему «Роль оксида азота в синаптической пластичности и деградации белков в нейронах» соответствует критериям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности физиология – 03.03.01, а диссертант заслуживает искомой степени.

Старший научный сотрудник лаборатории биохимии процессов онтогенеза Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН», кандидат биологических наук *Людмила Ю.В.*

Почтовый адрес:

Россия, 119334, Москва,

ул. Вавилова, д. 26.

ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН

телефон: 7(499)135-88-47

адрес электронной почты: yulial@bk.ru

Подпись официального оппонента заверяю:

Ученый секретарь ФГБУН Института ИБР РАН,

Кандидат биологических наук, доцент,

26 апреля 2017 года

М.Ю. Хабарова

