

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Шарипова Рината Рашидовича «Механизмы эксайтотоксичности при повторном действии глутамата: роль нарушения Ca^{2+} - и Na^{+} -гомеостаза и функционального состояния митохондрий», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Актуальность темы выполненной работы

Общеизвестно, что процессы жизнедеятельности, происходящие в головном мозге в норме и при патологии, чрезвычайно многообразны и сложны. Экспериментальные исследования последних лет *in vivo* показали, что повторный эпизод церебральной ишемии имеет более тяжелые последствия, чем однократный, даже более длительный. Внутри- и межклеточные реакции в постишемический период, сопряженные с энергетическим дефицитом и нарушением ионного гомеостаза нейронов, запускаются, в частности, в результате гиперактивации ионотропных глутаматных рецепторов в зоне полутени (пенумбры), окружающей очаг необратимого повреждения ткани мозга. Однако относительно механизмов отсроченной гибели нейронов в пенумбре при их вторичной кальциевой перегрузке под влиянием глутамата многое остается невыясненным, и интерпретация результатов исследований в этом направлении далеко не всегда однозначна. Несмотря на достигнутые успехи в исследованиях мозга в экспериментах на целом животном, первичные культуры центральных нейронов еще надолго останутся важнейшим объектом исследований механизмов повреждения нейронов при ишемии. Поэтому диссертационное исследование Р.Р.Шарипова, связанное с моделированием *in vitro* особенностей патологических процессов, происходящих в головном мозге при ишемическом инсульте, представляется своевременным и актуальным.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа построена по традиционной схеме и содержит оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список использованной литературы. Работа изложена на 166 страницах, включает 41 рисунок и 1 таблицу. Список литературы состоит из 336 работ.

Во введении автор излагает основные концепции, касающиеся механизмов эксайтотоксической гибели нейронов в культурах и роли длительной активации

ионотропных глутаматных рецепторов в избыточной перегрузке цитоплазмы нейронов ионами Ca^{2+} и Na^+ , и обосновывает актуальность исследования, его цели и задачи.

Глава «Обзор литературы» раскрывает современное состояние проблемы по теме диссертации и логически связана с последующими главами. Схемы, поясняющие текст, подобраны достаточно удачно и, благодаря сохранению цветовой палитры изображений, высоко информативны.

Глава «Материалы и методы» полезна для понимания природы объекта, его недостатков и преимуществ. Наиболее подробно описано приборное обеспечение работы, особенно методы флуоресцентной микроскопии. Такая детализация выбора светофильтров, флуоресцентных индикаторов и зондов, условий регистрации сигналов вполне оправдана, учитывая физико-техническое образование диссертанта и сложность использованных методик. Завершается глава кратким изложением методов статистической обработки результатов и обчета данных и в целом она убеждает, что все эксперименты выполнены лично автором и с полным пониманием всей сложности использованных методов.

В главе «Результаты и обсуждение» показаны изменения внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), измеренные совместно с одновременной регистрацией мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$). Автор использовал различные методические приемы, варьируя ионный состав среды, концентрацию глутамата (Glu) и протонофора. Оказалось, что латентный период наступления отсроченной кальциевой дизрегуляции (ОКД), лежащий в диапазоне от единиц до десятков минут, при повторном воздействии Glu сокращается настолько значительно, что явление выглядит, как потеря нейронами индивидуальности Ca^{2+} -ответов на Glu.

Далее диссертант проверил, можно ли развитие ОКД полностью объяснить образованием неспецифической поры высокой проводимости во внутренней мембране митохондрий. Показано, что замена Ca^{2+} на Sr^{2+} , который, по данным литературы, способен проникать сквозь плазматическую и внутриклеточные мембраны по тем же каналам, что и Ca^{2+} , но препятствует образованию поры, не предотвращает развитие ОКД, хотя и замедляет кинетику этого процесса. Несмотря на то, что эти результаты не дают окончательного ответа на поставленный вопрос и получены с применением только одного методического приема, они ставят под сомнение универсальность митохондриальной поры как главной причины ОКД как при первом, так и при повторном воздействии Glu.

Предпринятые автором одновременные измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ позволили показать, что даже слабая деполяризация митохондрий, вызванная низкой концентрацией протонофора, резко ускоряет ОКД. Этот результат интересен тем, что, как было показано

ранее в коллективе, где выполнялось данное диссертационное исследование, подобный эффект могут вызывать эндогенные жирные кислоты, образующиеся при эксайтотоксическом действии Glu.

Затем были исследованы биоэнергетические аспекты, связанные с функционированием митохондрий в условиях глутаматной нейротоксичности. Измеряя УФ-возбудимую автофлуоресценцию нейронов и одновременно используя окрашивание потенциал-чувствительным зондом Rh123 и кальциевым индикатором XRhod-FF, автору удалось связать изменения $\Delta\Psi_m$ с изменениями концентраций Ca^{2+} , АТФ и NADH как основного субстрата дыхательной цепи. Эти результаты послужили основой для заключения о том, что опережающий коллапс [АТФ] и полное исчерпание NADH, хотя и вносят существенный вклад в ОКД, но не являются единственными ее причинами.

Серьезное внимание было уделено натриевому насосу (натрий-калиевой АТФазе, NKA) – основному потребителю АТФ в нейронах. Автор, по уже зарекомендовавшей себя схеме, провел одновременные измерения $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$ в буферах с различным содержанием Na^+ и показал, что регулирование натриевого потока в клетку имеет критическое значение для поддержания Ca^{2+} гомеостаза, а гомеостаз Na^+ столь значительно зависит от энергетики нейронов, что по изменениям $[Na^+]_i$ можно судить об изменениях [АТФ].

Наконец, было проверено, насколько МТТ-анализ, широко применяемый для оценки выживаемости самых разнообразных клеток, может быть использован для определения активности дегидрогеназ цикла трикарбоновых кислот и ферментных комплексов дыхательной цепи. Важность этого исследования обусловлена тем, что дегидрогеназы, локализованные в матриксе митохондрий, и дыхательные комплексы внутренней митохондриальной мембраны являются единой системой, на которой базируется биоэнергетика нейронов. Благодаря комплексному применению трансмиссионной и флуоресцентной микроскопии, было установлено, что восстановление солей тетразолия до формазана позволяет оценить активность комплекса I дыхательной цепи непосредственно в индивидуальной клетке. Стоит отметить, что именно этот комплекс играет критическую роль в клеточном и молекулярном механизмах патогенеза болезни Паркинсона.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Новизна проведенного исследования состоит, прежде всего, в том, что, благодаря комплексному подходу, с применением разнообразных флуоресцентных ионных индикаторов и зондов в сочетании с селективными ингибиторами и подбором ионного состава сред, автору удалось показать, что возникновение отсроченной кальциевой

дизрегуляции не обязательно обусловлено истощением АТФ в цитозоле. Более тщательно выяснена роль накопившегося в клетках Na^+ в энергетическом балансе нейронов и преодолении ими Ca^{2+} -плато, ведущего к гибели клеток. Сочетание трансмиссионной и флуоресцентной микроскопии позволило показать, что МТТ-анализ, используемый традиционно для тестирования выживаемости клеток, может быть применен для определения активности комплекса I дыхательной цепи митохондрий непосредственно в живых нейронах.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные автором результаты расширяют представления о последовательности и характере патофизиологических процессов, происходящих при Ca^{2+} -перегрузке нейронов, вызванной гиперстимуляцией глутаматных ионотропных рецепторов. Кроме того, они добавляют новые данные к проверке ключевого события в функционировании митохондрий, обусловленному формированием неспецифической митохондриальной поры высокой проводимости, ведущим к энергетическому истощению нейронов и их отсроченной гибели в результате высвобождения из митохондрий факторов апоптоза. Эти фундаментальные результаты следует учитывать при разработке новых лекарственных средств, направленных на нормализацию функционирования митохондрий, в частности, комплекса I дыхательной цепи, в условиях кальциевой перегрузки нейронов.

Замечания и рекомендации.

Обзор литературы в основном состоит из цитирования работ 2012-2017 гг., но не приводит ни одной публикации 2018 г., хотя у автора было время для анализа самых последних статей, например, таких: Hamilton J. et al. *J. Biol. Chem.*, 2018, **293**, 15652-15663; Kalani K. et al. *Drug Discov. Today*, 2018, **23**, 1983-1989; Stockburger C. et al. *J. Alzheimers Dis.*, 2018, **64** (s1), S455-S467; Reiner A., Levitz J. *Neuron*, 2018, **98**, 1080-1098. Кроме того, обзор, как мне кажется, был бы более информативным, если бы в нем было больше внимания уделено сведениям о регуляторной роли нейроглиальных взаимодействий, поскольку в исследованиях экспрессии АТФ-сенсора использованы клеточные культуры гиппокампа, где доля глиальных клеток достигает 40-60%. Измерение изменений концентрации АТФ в отдельных нейронах является одним из наиболее важных разделов диссертационной работы, однако в «Обзоре литературы» автор не уделяет должного внимания применению флуоресцентных белковых сенсоров, что снижает, на мой взгляд, информативность этой главы и ее логическую связь с «Результатами и обсуждением». Как в обзоре, так и в результатах недостаточно полно показана роль метаботропных глутаматных рецепторов в исследованиях по теме

диссертации. Стил ь изложения не всегда удачен (как, например, фраза «Испускание глутамата...» в подписи под рисунком 2).

В главе «Материалы и методы» способы приготовления культур можно было бы изложить более кратко. На всех микрофотографиях клеток, за исключением рисунка 32, следовало указать масштаб. Заголовки рисунков зачастую сформулированы как заключения, следующие из представленных на рисунке данных. Заголовок должен отражать в наиболее обобщенном виде содержание рисунка, а не следствие представленных на рисунке данных, что более уместно в тексте. Учитывая многосторонний характер исследования, в заключительной части диссертанту стоило бы привести обобщенную схему тех состояний митохондрий и ионных потоков в нейронах, которые, согласно данным его исследования, характеризуют переход от нормальной глутаматной сигнализации к эксайтотоксичности.

Приведенные замечания имеют не принципиальный, а рекомендательный характер, и не подвергают сомнению адекватность использованных методов и достоверность полученных результатов. Работа представляется новой, интересной, проведенной на высоком теоретическом и методическом уровне, и опирается на солидную приборную базу.

Заключение

Примененные усовершенствованные автором методы мультипараметрических флуоресцентно-микроскопических измерений позволили успешно решить поставленные задачи. Работа выполнена с использованием большого объема экспериментального материала и с привлечением разнообразного арсенала методов оптической, в первую очередь, флуоресцентной микроскопии и статистической обработки результатов, что позволяет считать полученные результаты достоверными, а сделанные выводы – обоснованными. Данные, полученные Р.Р.Шариповым, значительно расширяют фундаментальные представления о клеточных и молекулярных механизмах нейродеструктивных процессов при гиперстимуляции ионотропных глутаматных рецепторов и могут быть востребованы при разработке методов моделирования острых и хронических форм церебральной патологии, сопряженных с дисфункцией митохондрий.

Основные результаты работы приведены в 9 публикациях, в том числе в 3 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ и входящих в список Web of Science и Scopus, и в 6 публикациях в материалах научных мероприятий. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

В целом диссертационную работу Р.Р.Шарипова можно рассматривать как законченное исследование, выполненное в рамках актуального направления в области

физиологии, патофизиологии и биофизики клетки и содержащее решение задачи, имеющей важное фундаментальное значение для экспериментальной нейробиологии. По актуальности поставленных вопросов, объему и тщательности выполнения экспериментов, а также по уровню полученных результатов данная работа соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г, в редакции от 21 апреля 2016 г. №335 и Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03-патологическая физиология.

Официальный оппонент,
заведующий лабораторией экспериментальной
нейробиологии Отдела исследований мозга
ФГБНУ «Научный центр неврологии»
д.б.н.



Л.Г. Хаспеков

Подпись д.б.н. Л.Г. Хаспекова заверяю.
Ученый секретарь ФГБНУ «Научный центр неврологии»
к.м.н.
3 декабря 2018 г.



А.Н. Евдокименко

Адрес организации:
ФГБНУ «Научный центр неврологии». 125367, г. Москва, Волоколамское ш., д. 80.
Тел. +7 4954902109. E-mail: dnr@neurology.ru.
Отдел исследований мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии». 105064, г. Москва,
пер. Обуха, д.5. Тел. оппонента: +7 916 578 19 71. E-mail: khaspekleon@mail.ru.