

Отзыв официального оппонента,
Максимова Георгия Владимировича на диссертацию
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 исследования.

Диссертация Шарипова Р.Р. посвящена актуальной проблеме современной физиологии исследованию молекулярных механизмов функционирования нейронов в норме и при патологии. Согласно современным представлениям, ключевую роль в гибели нейронов мозга при ишемии/гипоксии выполняет длительная активация рецепторов к глутамату при формировании гипоксии в области «ишемического ядра» и нарушении метаболизма нейронов. В обзоре литературы автор детально анализирует данные, свидетельствующие о том, что стимуляция глутаматных рецепторов, прежде всего ионотропных рецепторов NMDA-типа, приводит к дополнительному увеличению в клетке $[\text{Na}^+]_i$ и двухфазному увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$, а также нарушению энергетических процессов и гибели нейронов. Особое внимание Шарипов Р.Р. уделяет анализу характеристик второй фазы увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (отсроченная кальциевая дизрегуляция, ОКД), которая сопровождается изменениями трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий ($\Delta\Psi_m$) за счет формирования неспецифической поры и нарушения ионного гомеостаза.

Цель диссертации Шарипова Р.Р. заключалась в выявлении роли митохондрий в нарушениях гомеостаза ионов Ca^{2+} и Na^+ в нейронах мозга

крысы при ишемии/гипоксии мозга при повторном действии глутамата («сенситизация нейронов»).

Общая характеристика работы

Диссертация Шарипова Р.Р. написана в традиционном стиле и содержит: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы и библиографический указатель, включающий работы на русском (18) и иностранном (318) языках. Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста и содержит 1 таблицу и 41 рисунок.

Описание *методов* дается автором достаточно подробно и ясно, что позволяет представить дизайн и ход эксперимента. В исследовании использовались культуры нейронов головного мозга крысы и современные методы биологии клетки и физиологии. Эксперименты выполнены на установке, включающей инвертированный микроскоп Olympus IX-71, оснащенный 20x и 40x объективами, систему освещения Sutter Lambda 10-2 со 175Вт ксеноновой лампой (Sutter Instruments) и CCD-камеру CoolSNAP HQ2 (Photometrics), контролируемую компьютерной программой MetaFluor (Molecular Devices). В экспериментах использовались различные комбинации зондов с непересекающимися парами длин волн возбуждения и эмиссии. Для измерения $[Ca^{2+}]_i$ клетки перфузировали низкоаффинными Ca^{2+} -чувствительными зондами: Fura-FF, Fluo-5N, Rhod-5N или X-Rhod-FF. Изменения разности потенциалов на внутренней мембране митохондрий ($\Delta\Psi_m$) контролировали с помощью флуоресценции зондов Rhodamine 123 (Rh123) или TMRM. Измерение трансмембранной разности потенциалов плазматической мембраны регистрировали с помощью флуоресценции зонда DiBAC₄(3). Локализацию митохондрий в клетке определяли с помощью митотрекера зеленого (MitoTracker Green, MTG). Для идентификации ядерной ДНК использовали Hoechst 33342. Для измерения [АТФ]

осуществляли трансфекцию плазмидой, экспрессирующей белковый сенсор АТ1.03.

Отмечу, что автор разработал новый подход - изменение флуоресценции белка-акцептора в АТ1.03 для мониторинга относительных изменений рН цитозоля. Результаты исследования обрабатывали с помощью программы Metafluor (Universal Imaging Corp., USA) и таблицы Microsoft Excel для отдельно выбранных областей. Изображения клеток в культуре получены с помощью программы ImageJ. Оформление и представление индивидуальных и статистических данных производилось с помощью компьютерной программы GraphPad PRIZM.

Раздел диссертации *Результаты и их обсуждение* рационально структурирован, логично и подробно сформулирован. Раздел *Заключение* адекватно обобщает полученные результаты и следующие из них ключевые выводы.

Основные результаты

Результаты работы Шарипова Р.Р. свидетельствуют о том, что в развитие ОКД при повторном воздействии глутамата представляет собой комплексный процесс, зависящий от индивидуальных особенностей нейрона. Для полного описания функционального состояния этих клеток следует учитывать не только изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$, но и степень набухания нейронов, количество Ca^{2+} в митохондриях, рН, $[Na^+]_i$, [АТФ]_с и [NADH]. В связи с этим, автор констатирует, что при тестировании развития ОКД следует учитывать восстановление функционального состояния митохондрий, баланса ионов, соотношения внутри- и внеклеточного пространства. Важно, что вещества, способствующие быстрому восстановлению $[Na^+]_i$ и [АТФ] после прекращения действия глутамата, могут быть перспективными при разработке препаратов и методологии терапии.

Шариповым Р.Р. доказано, что МТТ-тест, можно использовать не только для анализа выживаемости клеток, но в сочетании с оптической и

флуоресцентной микроскопией исследовать активность отдельных комплексов дыхательной цепи митохондрий в функционирующих клетках.

Научная и практическая значимость

Приведённые автором исследования значительно расширяют представления о действии глутамата, способствующем увеличению протонной проводимости внутренней мембраны митохондрии или частичному блокированию дыхания и дисбалансу кальциевого гомеостаза. Важно, что снижение содержания АТФ и NADH в нейронах не является единственным условием развития отсроченной кальциевой дисрегуляции. При анализе механизма эксайтотоксичности следует учитывать как внутри-, так и внеклеточную концентрацию Na^+ . Отметим, что сочетание методов флуоресцентной и оптической микроскопии позволяет использовать МТТ-анализ для количественной оценки активности дегидрогеназ ферментов гликолиза, цикла Кребса и комплексов дыхательной цепи митохондрий.

Отмечу, что основные результаты работы доложены автором на ряде международных и отечественных конференций. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах (из перечня ВАК) и 6 тезисов в сборниках материалов научных конференций. Личный вклад Шарипова Р.Р. заключается в выполнении экспериментов, обработке данных, представлении результатов в докладах, участие в обсуждении и подготовке результатов к публикации. Все основные экспериментальные данные диссертационного исследования получены автором лично.

Замечания

Принципиальные замечания по диссертационной работе Шарипова Р.Р. отсутствуют, но есть некоторые вопросы и замечания:

- 1) Что автор имел в виду на «имела невысокую, но значимую корреляцию»; «но и в особенностях процессов, происходящих в клетках в период высокого Ca^{2+} -плато»?

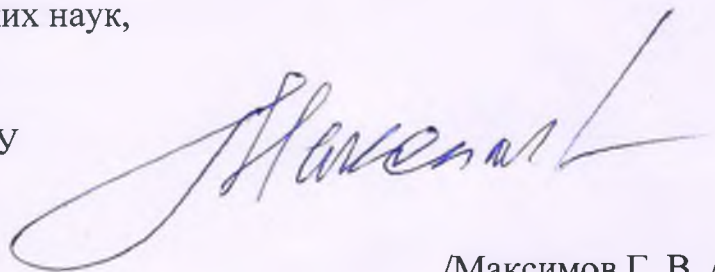
- 2) Некоторые термины и фразы используются не правильно или недостаточно обоснованы: «Индивидуальность нейронов нивелировалась при повторном действии глутамата»; «служат самым емким внутриклеточным Ca^{2+} -депо»; «развитие энергетического кризиса, приводящего к дисбалансу ионного гомеостаза, кульминацией которого является ОКД»; «внесинаптические NMDAR связаны с некоторыми путями клеточной смерти»; «Рис. 1. Испускание и обратный захват глутамата в синаптическом контакте»; «подъем внеклеточных уровней Glu»; «препятствует дальнейшему преодолению липидных мембран»; «При повышении $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в результате ОКД, цвет клеток меняется на красный»; «Глубокое снижение $[\text{NADH}]$ »; «Потенциалы действия обратного распространения, возникающие за счёт глиальных клеток»; поглощается глутамат нейронами «через систему аксонального транспорта»;
- 3) «Именно благодаря поступлению Na^+ через AMPA каналы, клеточный мембранный потенциал может снизиться до такого уровня, что это приведет к высвобождению иона Mg^{2+} из NMDA канала (снятие потенциал-зависимого Mg^{2+} -блока) и поступлению ионов Ca^{2+} в клетку.»
Очевидно, что потенциал мембраны должен увеличиться!?
- 4) Нужно подробно объяснить термин и механизм «Рэйшиометрический сигнал этого белкового сенсора практически не зависит от pH в диапазоне от 7,1 до 8,5, что позволяет оценивать концентрацию АТФ в физиологических условиях (нормальный pH цитозоля ~7.3)»
- 5) Где соответствие? «Общая площадь нейронов при воздействии глутамата увеличилась на ~40%, что соответствует увеличению объёма на ~65% или изменению диаметра на ~20%, что соответствует данным, полученным с помощью лазерной интерференционной микроскопии» Как это и методы (ЛИМ) разные?

б) Не понятно, что происходит с ионными токами и объемом нейрона при «поступление Na^+ в цитозоль, заменив его в буфере на непроникающий органический катион N-метил-D-глюкозамин (NMG).

Выводы

Диссертационную работу Шарипова Р.Р.. можно рассматривать как законченное исследование, выполненное в рамках самостоятельного и оригинального направления в области физиологии и биофизики клетки. По целесообразности поставленных задач, объему и тщательности выполнения экспериментов, а также по уровню полученных результатов данная диссертационная работа соответствует требованиям п.9 Положения «О присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г, в редакции от 21 апреля 2016 г. №335), а ее автор, Шарипов Ринат Рашидович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 - «Патологическая физиология».

Профессор, доктор биологических наук,
профессор кафедры биофизики
биологического факультета МГУ



/Максимов Г. В. /

Московский государственный
Университет имени М. В. Ломоносова,
биологический факультет
119991, Москва, ГСП-1,
Ленинские горы, д. 1, стр. 12
тел. (8-495) 9392776
факс (8-3182) 9394309
E-mail: info@mail.bio.msu.ru



*Подпись профессора, д.б.н. Г.В. Максимова, заверено.
Декан биологического факультета МГУ
академик М.П. Курочкин
07.12.2018*