

УТВЕРЖДАЮ

И.о. проректора по научной и исследовательской деятельности, доктор химических наук, доцент



А.В. Метелица

2018г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет» о диссертационной работе Шарипова Рината Рашидовича «Механизмы эксайтотоксичности при повторном действии глутамата: роль нарушения Ca^{2+} и Na^{+} гомеостаза и функционального состояния митохондрий», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Актуальность темы выполненной работы

Глутамат-опосредованная эксайтотоксичность – ведущий механизм ишемического поражения мозга при инсульте. Массивный выброс ионов глутамата из поврежденных нейронов стимулирует входной поток ионов кальция в соседних нейронах, расширяя таким образом зону поражения мозга. Поэтому изучение ионных и биоэнергетических механизмов эксайтотоксичности имеет важное значение для понимания глубинных процессов ишемического поражения мозга.

Использование первичных культур нейронов мозга животных позволяет проводить эксперименты в контролируемых условиях и применить большой методический арсенал для получения более определенно интерпретируемых данных, чем это возможно на животных. В этой связи несомненный интерес представляет диссертационное исследование Шарипова Р.Р., посвященное моделированию на нейрональных культурах патологических процессов, происходящих в мозге при ишемическом инсульте и сопряженных с энергетическим кризисом и гиперактивацией глутаматных ионотропных рецепторов в зоне пенумбры, окружающей ядро инфаркта в ткани мозга.

Научная новизна исследования

Автором впервые сформулировано и исследовано явление сенситизации нейронов к повторному действию глутамата (Glu), проявляющееся в сильном сокращении латентных периодов отсроченной кальциевой дерегуляции (ОКД). Большая часть работы посвящена исследованию факторов, которые могут быть вовлечены в это явление.

С помощью замены Ca^{2+} на Sr^{2+} было показано, что открывание высокопроницаемой поры (РТР) во внутренней мембране митохондрий не является обязательным условием развития ОКД при повторном действии Glu. Оказалось, что небольшого снижения митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) за счет увеличения протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий с помощью низких концентраций экзогенного протонофора, может быть достаточно для сокращения времени наступления ОКД.

Основными факторами возникновения «сенситизации» Р.Р. Шарипов называет истощение и недостаточное восполнение энергетических ресурсов клетки – АТФ и NADH. Повторное воздействие Glu может наступать при заметно меньших концентрациях [АТФ] и [NADH], чем в покоящихся нейронах.

Для обоснования возможных причин плохого восполнения энергетических ресурсов была исследована динамика внутриклеточной концентрации Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$) при повторном действии Glu. Оказалось, что при возникновении ОКД в нейроне длительно сохраняется повышенная $[\text{Na}^+]_i$ после удаления Glu, даже если $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ вернулись к значениям, близким к состоянию покоя. Автор проводит параллель между динамикой $[\text{Na}^+]_i$ и [АТФ]. Предполагается, что высокая $[\text{Na}^+]_i$ является одним из основных факторов, тесно связанных с плохим восполнением [АТФ] и [NADH], которые приводят к сенситизации нейронов при повторном действии Glu.

Теоретическая и практическая значимость результатов

Результаты работы Р.Р. Шарипова показывают, что отслеживания $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ не всегда достаточно для адекватной оценки состояния нейронов при развитии ОКД под действием Glu. Для более полного описания функционального состояния этих клеток следует также учитывать количество Ca^{2+} , захваченного митохондриями, рН цитозоля и митохондрий, степень набухания нейронов, $[\text{Na}^+]_i$, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, [АТФ] и [NADH].

При тестировании потенциальных нейропротекторов следует учитывать их влияние как на развитие ОКД, так и на восстановление функционального состояния митохондрий, $[\text{Na}^+]_i$ и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ после прекращения

эксайтотоксического действия Glu. Вещества, способствующие быстрому восстановлению $[Na^+]_i$ и [АТФ] после прекращения действия глутамата, имеют перспективу при разработке нейропротекторов. Обнаружено, что изменения $[Na^+]_i$ могут служить косвенной оценкой изменений [АТФ] в цитозоле. Также показано, что при совместном применении оптической трансмиссионной и флуоресцентной микроскопии МТТ-тест может дать информацию об активности отдельных комплексов дыхательной цепи митохондрий в индивидуальных клетках.

Полученные в диссертационном исследовании результаты позволяют лучше представить последовательность процессов, происходящих при кальциевой перегрузке нейронов, вызванной гиперстимуляцией глутаматных ионотропных рецепторов.

Рекомендации по использованию результатов и выводов

Результаты диссертационной работы Р.Р. Шарипова показали, что динамика $[Na^+]_i$ косвенно отражает изменения [АТФ] в процессе восстановления нормального функционального состояния нейронов после воздействия Glu, что может служить диагностическим признаком для оценки биоэнергетики нервных клеток.

Кинетический подход, позволяющий измерять восстановление тетразолия до формазана с помощью флуоресцентной и оптической трансмиссионной микроскопии, может быть полезным при исследованиях различных клеточных культур, в частности, для измерений кинетики редокс-процессов на планшетных ридерах, для анализа выживаемости клеток и активности дегидрогеназ в большом количестве образцов.

Результаты выполненной работы могут послужить основой для дальнейших исследований в области выяснения молекулярно-клеточных механизмов глутаматной эксайтотоксичности и быть использованы в лекционных курсах в научных и учебных организациях: МГУ им. М.В. Ломоносова, МФТИ, ИБХ РАН, ИБР РАН, ИФАВ РАН, ИБК РАН, 1-й Мед. университет им. И.М. Сеченова, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Институт цитологии РАН, ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН, Южный федеральный университет и др.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Шарипова Р.Р. построена по традиционной схеме и состоит из следующих разделов: Введение, Актуальность, Цель и Задачи

исследования, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты исследования и их обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы. Объем диссертации составляет 166 страниц, содержит 41 рисунок и 1 таблицу. Список литературы включает 336 работ.

Во **Введении** Р.Р. Шарипов приводит основные представления относительно механизмов гибели нейронов в культурах и роли продолжительного возбуждения глутаматных ионотропных рецепторов, приводящего к избыточному поступлению Ca^{2+} и Na^+ в цитозоль нейронов.

Глава **Обзор литературы** включает две трети ссылок из перечисленных в списке литературы. В целом, обзор логично изложен. Схемы, поясняющие текст, подобраны достаточно удачно. Около четверти использованных в обзоре работ датирована 2013-2017г.г., свидетельствуя о внимательном отношении Р.Р. Шарипова к научным новостям по теме диссертации. Это благоприятное впечатление несколько страдает от отсутствия в Списке литературы последних работ, опубликованных в 2018 г.

Глава **Материалы и методы** содержит достаточно подробные описания способа получения культур клеток, условий проведения экспериментов, обработки и анализа данных. Стоит отметить, что измерение динамики [АТФ] в отдельных клетках – относительно новый метод. Приобретенный опыт позволил диссертанту использовать АТФ-чувствительный флуоресцентный белковый сенсор не только для мониторинга [АТФ], но одновременно и для оценки изменений рН цитозоля.

Методы флуоресцентной микроскопии подробно представлены. Благоприятное впечатление оставляет детальное описание выбора светофильтров, зондов и индикаторов, условий регистрации сигналов. Завершается глава изложением методов статистической оценки достоверности результатов и методов обсчета данных.

В разделе **Результаты** представлены полученные данные, их анализ и обсуждение. Он состоит из семи параграфов, посвященных отдельным аспектам данной работы. Автор демонстрирует явление сенситизации нейронов к повторному воздействию Glu и показывает, что ОКД может возникать в условиях, препятствующих открыванию высокопроницаемой мембранной поры. При этом небольшое повышение протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий способствует развитию ОКД и сенсбилизации. Исследования изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$, [NADH], [АТФ], рН цитозоля и $[\text{Na}^+]_i$ при действии Glu и в пост-глутаматный период показывают, что эксайтотоксичность характеризуется сложной динамикой. Поэтому мультипараметрические измерения являются настоящей необходимостью

для корректной интерпретации результатов. Изменения $[Na^+]_i$ являются, по-видимому, «недооцененным» параметром, т.к. поддержание Na^+/K^+ баланса требует, вероятно, наибольших энергетических затрат, особенно при повторных воздействиях Glu, проявляющихся в сенсibilизации. Последний раздел главы «Результаты» посвящен методу оценки активности митохондриальных дегидрогеназ с помощью восстановления соли тетразолия МТТ до формазана. Здесь автор применяет разнообразных биохимические подходы для раскрытия особенностей работы дыхательной цепи и взаимосвязи митохондриальной биоэнергетики с гликолизом.

В разделе **Заключение** логично обобщены результаты данного исследования и показана взаимосвязь между результатами.

Степень обоснованности научных положений и выводов

Научные положения, выносимые на защиту Р.Р. Шариповым, получены при помощи современных методов флуоресцентной микроскопии и селективных зондов. Результаты статистически обработаны. В диссертационной работе получен большой объем экспериментальных материалов, которые убедительно обосновывают положения, выносимые на защиту. Они не оставляют сомнений в том, что явление сенсibilизации нейронов к повторному действию глутамата тесно связано с энергетическим состоянием митохондрий. Представленные Р.Р. Шариповым результаты достоверны, сделанные выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными. Полученные данные важны для понимания фундаментальных процессов, происходящих при гибели нейронов, вызванной избыточной стимуляцией глутаматных ионотропных рецепторов и могут быть использованы при разработке новых методов диагностики и лечения ишемии мозга, инсульта и нейродегенеративных заболеваний, сопряженных с дисфункцией митохондрий.

Основные замечания:

1. При обсуждении полученных результатов автор рассматривает только роль NMDA-рецепторов в эксайтотоксичности глутамата и митохондрии, как основной механизм противодействия этому воздействию. Но при этом не уделяется должного внимания глутаматным рецепторам других типов (AMPA и каинатным).

2. Подробно описывая роль митохондрий в поддержании кальциевого гомеостаза при глутаматной эксайтотоксичности, автор не уделяет должного внимания другим механизмам поддержания и стабилизации уровня ионов

кальция в клетках, таких как их депонирование в эндоплазматическом ретикулуме, выведение из клетки кальциевой АТФазой и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменником плазматической мембраны, связывание белками, которые также могут противодействовать глутаматной эксайтотоксичности.

3. Р.Р. Шарипов интерпретирует полученные данные по кинетике развития ОКД и падению $[\text{NADH}]$ и $[\text{АТФ}]$, как свидетельство того, что Ca^{2+} дерегуляция развивается прежде, чем наступает энергетический коллапс в форме предельно низкого падения $[\text{NADH}]$ и $[\text{АТФ}]$. Однако не все графики, иллюстрирующие это положение, служат несомненным подтверждением вывода автора. Например, Рис.23А показывает почти 80% снижение $[\text{АТФ}]$ относительно базального уровня в покое нейроне. Можно ли такое сильное падение $[\text{АТФ}]$ считать отсутствием энергетического коллапса клетки, особенно, в сочетании со значительным закислением цитозоля?

4. Хотя исследование функционального состояния митохондрий является сквозной темой работы, заключение о связи МТТ-теста с ролью активности митохондриальных дегидрогеназ в развитии ОКД, сформулировано не очень убедительно.

Изложенные замечания имеют рекомендательный характер. Они не являются указанием на принципиальные ошибки, а скорее относятся к не всегда удачному и достаточно подробному изложению. Они не подвергают сомнению адекватность использованных методов и достоверность полученных результатов.

Работа представляется новой, интересной, проведенной на высоком теоретическом и методическом уровне, опирающейся на современную приборную базу.

Результаты работы изложены в 9 публикациях, в том числе в 3 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ и входящих в список Web of Science, и в 6 тезисах докладов на российских и международных конференциях.

По актуальности, научной новизне и практической значимости представленное исследование соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Заключение

Диссертационная работа Шарипова Рината Рашидовича «Механизмы эксайтотоксичности при повторном действии глутамата: роль нарушения Ca^{2+} и Na^+ гомеостаза и функционального состояния митохондрий» на соискание ученой степени кандидата биологических наук является научно-

квалификационной работой. В ней выясняется роль митохондрий в нарушениях гомеостаза ионов Ca^{2+} и Na^{+} в первичных культурах нейронов головного мозга крысы при повторном действии глутамата. Изученные процессы имеют существенное значение при развитии патологических процессов при ишемии/гипоксии головного мозга.

Диссертационная работа соответствует требованиям п.9 Положения «О присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор, Шарипов Ринат Рашидович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 - «Патологическая физиология».

Отзыв подготовлен доктором биологических наук (специальность 03.00.02 – Биофизика), профессором, главным научным сотрудником, руководителем лаборатории «Молекулярная нейробиология» Академии биологии и биотехнологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет» Узденским Анатолием Борисовичем (344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1, тел: +7 (905) 4287254; e-mail: auzd@yandex.ru).

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре лаборатории «Молекулярная нейробиология» Академии биологии и биотехнологии ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», протокол № 8 от 19 ноября 2018 г.

Главный научный сотрудник,
руководитель лаборатории
«Молекулярная нейробиология»
Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского
ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»,
доктор биологических наук,
профессор Узденский Анатолий Борисович

19.11.2018



Личную подпись Узденского А.Б.

ЗАВЕРЯЮ:

Специальность: работа с персоналом
I категории *И.И. Подшивалова* 11.11.
« 22 » ноября 2018 г.