

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
ИНСТИТУТА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА
И Ю.А. ОВЧИННИКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИБХ РАН) ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 8 октября 2014 г. № 10

О присуждении **Матлашову Михаилу Егоровичу**, гражданину РФ, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Молекулярные инструменты для модуляции редокс-статуса и мониторинга активности нейронов» по специальности 03.01.03 - молекулярная биология принята к защите 25.06.2014 г., протокол №8 диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (адрес: Российская Федерация, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; Приказ Минобрнауки России от 15 февраля 2013 г. №75/нк).

Соискатель Матлашов Михаил Егорович 1989 года рождения. В 2010 году соискатель окончил Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова по специальности «биохимия». В 2013 году окончил аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. В настоящее время (и в период подготовки диссертации) работает в должности младшего научного сотрудника в группе биологии активных форм кислорода Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в группе биологии активных форм кислорода Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель - доктор биологических наук Белоусов Всеволод Вадимович, должность – старший науч. сотр., руководитель группы биологии активных форм кислорода Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Малышев Алексей Юрьевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной нейробиологии обучения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук.

Плотников Егор Юрьевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории структуры и функции митохондрий Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (ИНБИ РАН), Москва в своём положительном заключении, подписанном д.х.н., профессором Савицким А.П., руководителем лаборатории физической биологии ИНБИ РАН, указала, что диссертационная работа Матлашова Михаила Егоровича соответствует требованиям п.9 "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а ее автор, Матлашов Михаил Егорович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «Молекулярная биология».

Соискатель имеет 6 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 3 работы объемом 2 печ. листа, опубликованные в зарубежных научных изданиях, включённых в библиографическую базу Web of Science. Научные работы по теме диссертации, в которые автор внёс основной или существенный вклад:

1. Mishina N., Markvicheva K., Bilan D., **Matlashov M.**, Liebl D., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V. Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a genetically encoded fluorescent probe. *Methods in Enzymology* 2013; 526:45-59.
2. Bilan DS, **Matlashov ME**, Gorokhovatsky AY, Schultz C, Enikolopov G, Belousov VV. Genetically encoded fluorescent indicator for imaging NAD(+)/NADH ratio changes in different cellular compartments. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014 Mar; 1840(3):951-7.
3. **Matlashov ME**, Belousov VV, Enikolopov G. How much H₂O₂ is produced by recombinant D-amino acid oxidase in mammalian cells? *Antioxidants and Redox Signaling*. 2014 Mar 1;20(7):1039-44.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н. Плотникова Егора Юрьевича. Отзыв положительный. Содержит следующие замечания: 1) В работе нет достаточных

доказательств нейрональной природы исследуемых клеток. Использование стандартного протокола не дает 100% гарантии того, что исследуемые клетки являются именно нейронами, а не астроглией, которой по определению в той или иной степени всегда загрязнена такая культура. По морфологии эти клетки в культуре могут быть весьма похожи и необходимо фенотипирование по специфическим маркерам нейронов и астроцитов. Соответственно, нельзя с уверенностью утверждать, что показанные изменения рН происходят именно в нейронах. Хотя очевидно, что в плане тестирования нового молекулярного сенсора это не имеет принципиального значения. 2) Хотелось бы уточнить насколько интактными были срезы гиппокампа, как это было доказано и не являются ли наблюдаемые изменения, например, рН артефактом повреждения клеток в процессе приготовления образца.

Отзыв официального оппонента д.б.н. Малышева Алексея Юрьевича. Отзыв положительный. Содержит следующие замечания: 1) Обзор литературы начинается с описания современных представлений о механизмах синаптической передачи и принципах ее регуляции. В этой части обзора местами чувствуется неуверенное владение физиологической терминологией, в одном месте попала даже явная ошибка, как например фраза о том, что «потенциал действия распространяется от дендритов к аксонам...» На самом деле ... потенциал действия в норме генерируется в начальном сегменте аксона и затем уже происходит его обратное распространение в дендриты. 2) Не ясно, почему автор не цитирует и не обсуждает работы группы К. Акермана (Raimondo et al., 2012; Raimondo et al., 2013). В этой группе были созданы три различных генетически кодируемых сенсора, с помощью которых путем комбинированной оптической и внутриклеточной регистрации было показано, как меняется уровень рН в нейронах во время эпилептиформной активности на переживающих срезах гиппокампа. Мне кажется, что именно с этими работами автор в первую очередь должен был бы сравнивать полученные им данные. 3) В некоторых местах работы не хватает статистической обработки данных. Так, один из главных результатов работы – разница в колебаниях рН в дендритах и аксонах, не обработан статистически. Строго говоря, если достоверность не подтверждена статистически, то мы не можем сделать вывод, отличаются две величины друг от друга или нет. Кроме того, автор отмечает разную временную динамику сигнала, отражающего уровень рН, в этих двух компартаментах. Эту разницу можно было бы формализовать путем несложной математической обработки, что, безусловно, украсило бы работу.

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный. Содержит следующие замечания: 1) Автору следовало бы провести дополнительную проверку полученных

результатов в эксперименте по определению рН в диссоциированной культуре нейронов, поскольку полученное в работе значение рН 7,4 значительно отличается от приведенного в литературе значения, равного 6,8. Логичным выглядело бы проведение контрольного эксперимента с использованием другого рН-сенсора. 2) Автору следовало бы подробнее описать существующие на данный момент сенсоры для детекции рН в живых системах и обосновать необходимость их усовершенствования, поскольку остается неясным, какими преимуществами обладает разработанный в работе сенсор SypHer2 в сравнении с существующими аналогами, а не только с его предшественником SypHer.

В ходе процедуры защиты диссертации соискатель в полной мере ответил на все замечания оппонентов и ведущей организации. Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их достижениями в области молекулярной биологии, нейрофизиологии, химии клеточного сигналинга и окислительного стресса, а также наличием большого количества публикаций в высокоцитируемых российских и зарубежных журналах по теме диссертации соискателя. Их высокая квалификация позволяет объективно оценить научную и практическую ценность настоящей диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что в результате выполненных соискателем исследований были получены два новых молекулярных инструмента: генетически кодируемый ратиометрический индикатор рН SypHer2, обладающий более высокой интенсивностью флуоресценции в клетках, чем его предшественник, а также инструмент для направленной контролируемой продукции пероксида водорода, на основе оксидазы D-аминокислот дрожжей *Rhodospiridium toruloides*. Были получены новые сенсоры для регистрации рН в синаптических структурах. Кроме того, была впервые показана возможность использования оксидазы D-аминокислот для продукции пероксида в нейронах.

Данная работа имеет высокую практическую ценность, поскольку полученные инструменты могут быть использованы для исследований в различных областях науки.

Помимо практического значения, диссертация представляет фундаментальный интерес. Автором было впервые обнаружена разница в динамике и амплитуде изменений рН в пре- и постсинаптических терминалях нейронов. В постсинаптическом окончании амплитуда рН-колебаний практически вдвое выше, чем в пресинапсе, что свидетельствует о высокой степени локализации метаболических процессов в нейронах. Кроме того, в работе было впервые продемонстрировано, что продуцируемый в аксоне пероксид водорода не попадает в тело и дендриты того же нейрона, что свидетельствует о высокой

активности антиоксидантных систем в нейроне, а также показывает возможность локального пероксидного сигналинга.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что работа выполнена на высоком методическом уровне с применением широкого спектра современных методов исследования – от молекулярно-биологических до методов клеточной нейрофизиологии. Исследование проведено с использованием большого экспериментального материала, что обеспечивает достоверность полученных данных. Полученные результаты хорошо проиллюстрированы и убедительно подтверждают сделанные автором выводы. Все исследования сопровождаются необходимыми контрольными экспериментами, показана воспроизводимость результатов. Наряду с данными, полученными впервые, были также проведены исследования для проверки используемых методов; результаты этих исследований хорошо согласуются с данными, полученными в других лабораториях.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в выборе направления исследований, разработке экспериментальных подходов, обработке и анализе полученных экспериментальных данных. Основные экспериментальные данные получены соискателем лично за исключением исследований на срезах мозга, выполненных совместно с коллегой из Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (Москва) к.б.н. Никитиным Евгением Сергеевичем. Подготовка основных публикаций по выполненной работе проведена лично или при непосредственном участии автора.

На заседании 08 октября 2014 г. диссертационный совет принял решение присудить Матлашову М.Е. учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 5 докторов наук по профилю диссертации (специальность 03.01.03 - молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовал: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Заместитель председателя
диссертационного совета

академик РАН Гришин Е.В.

Учёный секретарь
диссертационного совета

д. физ.-мат.н. Олейников В.А.

