

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н.Баха
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

119071 Россия, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Тел.: (495) 954-5283; факс: (495) 954-2732; e-mail: inbi@inbi.ras.ru

01.09.2014 № 12507 - 2171-469

На № 209-651.4-549 от 16.02.14

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор
Института биохимии им. А.Н.Баха РАН,
Чл.-корр. РАН, профессор, д.х.н.



 ПОПОВ В.О.

“01” сентября 2014 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию **Матлашова Михаила Егоровича** «Молекулярные инструменты для модуляции редокс-статуса и мониторинга активности нейронов», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности Молекулярная биология - 03.01.03.

Внутриклеточная среда нейронов характеризуется высокой динамичностью параметров, таких как рН и редокс-статус, влияющих на эффективность синаптической передачи. Значение рН влияет на активность некоторых ионных каналов и переносчиков в нервных окончаниях, в связи с чем существует гипотеза, что модуляция клеточного рН может являться одним из механизмов регуляции синаптической передачи. Высокий интерес вызывает также редокс-сигналинг в нейронах, поскольку показано участие супероксид аниона и пероксида водорода в регуляции синаптической передачи, и кроме того активные формы кислорода вовлечены в развитие нейродегенеративных заболеваний. Изучение взаимного влияния синаптической активности и

параметров внутриклеточной среды необходимо для понимания процессов, происходящих в мозге в норме и при патологиях.

Диссертационная работа Матлашова М.Е. посвящена важной теме – усовершенствованию генетически кодируемого рН-индикатора *SypHer* для мониторинга физиологической активности нейронов, а также получению генетически-кодируемого инструмента для контролируемой генерации пероксида

водорода в синаптических структурах на основе дрожжевой оксидазы D-аминокислот. Наличие подобного инструмента позволило бы более детально изучать редокс-сигналинг, в том числе влияние продукции пероксида в различных компартментах нейрона на эффективность синаптической передачи.

Автором был получен генетически кодируемый ратиометрический индикатор *SypHer2*, обладающий более высокой интенсивностью флуоресценции в клетках, чем его предшественник, и позволяющий количественно измерять значение внутриклеточного рН. Использование полученного индикатора совместно с Ca^{2+} -индикатором *R-Geco* показало, что спонтанная синхронная активность нейронов в культуре сопряжена с изменениями рН ~ на 0,1 единицу. Ингибиторный анализ показал, что изменения рН связаны скорее с активацией метаболических реакций, а не с транспортом ионов кальция, как это ранее считалось. Это наблюдение может иметь терапевтическое значение, поскольку синхронная активность наблюдается в мозге во время эпилептических припадков. Автор также получил конструкцию с пре- и постсинаптической локализацией и сравнил динамику рН в этих структурах в электрически активной культуре нейронов. В результате было впервые обнаружено, что в исследованных компартментах динамика рН различается, причём в постсинаптическом окончании амплитуда рН-колебаний практически вдвое выше, что должно отражать высокую степень локализации метаболических процессов в нейронах.

Помимо рН-индикатора, автор также получил инструмент для направленной контролируемой продукции пероксида водорода с использованием оксидазы D-аминокислот дрожжей *Rhodospiridium toruloides* (DAO). Так, с

помощью биосенсора HyPer можно наблюдать за продукцией пероксида водорода в клетках, трансфецированных DAO, в ответ на добавление D-аланина в клеточную среду. Помимо этого, была получена конструкция для пресинаптической локализации DAO в нейронах и показано, 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 доказывает возможность компарментализации перекисного сигналинга.

Однако автору следовало бы провести дополнительную проверку полученных результатов в эксперименте по определению pH в диссоциированной культуре нейронов, поскольку полученное в работе значение pH 7,4 значительно отличается от приведенного в литературе значения, равного 6,8. Логичным выглядело бы проведение контрольного эксперимента с использованием другого pH-сенсора.

Полученные результаты обладают несомненной значимостью для науки, медицины и фармакологии. Инструменты, разработанные автором, могут использоваться в фундаментальных научных исследованиях, а также способствовать развитию методов терапии нейродегенеративных заболеваний.

Диссертация написана по традиционному плану - работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы, включающего 255 ссылок. Диссертация изложена на 105 страницах и содержит 27 рисунков.

Материал диссертации изложен последовательно, результаты каждого раздела диссертационной работы взаимно дополняют и логически развивают положения, установленные автором ранее. Исследование проведено на высоком методическом уровне, проделан большой объем работы. Надежность и достоверность полученных данных обеспечивается квалифицированным применением современных молекулярно-биологических, биохимических и спектральных методов исследований. Сделанные выводы хорошо аргументированы. Диссертационная работа носит полноценный и заверенный характер как в научном плане, так и в оформлении. Результаты диссертационной

работы докладывались на международных и российских научных конференциях и опубликованы в российских и зарубежных журналах (всего 3 работы).

Обзор литературы адекватно отражает положение дел в области исследований регуляции рН в нейронах и влияния активных форм кислорода на их синаптическую активность. Однако 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.

Цели работы, усовершенствование генетически кодируемого рН-индикатора SypHer для мониторинга физиологической активности нейронов, а также получение генетически-кодируемого инструмента для контролируемой генерации пероксида водорода в синаптических структурах на основе дрожжевой оксидазы D-аминокислот, соответствуют поставленным задачам. Раздел, посвященный методам исследования, содержит подробное описание методов молекулярной биологии и микроскопии, а также работы с животными, и достаточно полно отражает спектр использованных методик. Результаты исследования полностью соответствуют поставленным задачам и выводам, а их изложение в диссертации - изложению в автореферате. В целом, диссертационная работа соответствует заявленной специальности Молекулярная биология - 03.01.03.

Такие результаты исследования, как получение генетически кодируемого инструмента для контролируемой генерации пероксида водорода в синаптических структурах на основе дрожжевой оксидазы D-аминокислот, можно квалифицировать как научные достижения, имеющие как фундаментальное, так и прикладное значение для молекулярной биологии, биомедицины и фармакологии.

Результаты исследования могут быть использованы в различных институтах РАН и РАМН (Институт биохимии имени А.Н.Баха РАН, Институт биологии гена РАН, Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН,

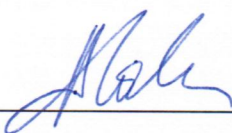
Институт молекулярной генетики РАН, Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Институт цитологии РАН, Институт цитологии и генетики СО РАН), на биологическом и химическом факультетах Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и Санкт-Петербургского государственного университета, а также других профильных институтах и университетах России и всего мира.

Высказанные замечания не умаляют значения полученных в работе результатов. Данная диссертационная работа 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».

Отзыв обсужден и утвержден на совместном семинаре лабораторий физической биохимии, биохимии хлоропластов, биомедицинских исследований и молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук», протокол №1 от 16 июля 2014 года.

Заведующий лабораторией физической биохимии,
доктор химических наук, профессор

Савицкий А.П.



1 сентября 2014 г.

