

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Матлашова Михаила Егоровича «Молекулярные инструменты для модуляции редокс-статуса и мониторинга активности нейронов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа М.Е.Матлашова посвящена разработке генетически кодируемых зондов для изучения параметров внутриклеточной среды нейронов. Значительный успех нейронаук, наблюдающийся в последнее время во всем мире, обусловлен, в значительной степени, активным привлечением в эту область науки молекулярно-биологических методов. Существует, к сожалению, и обратная взаимосвязь. Некоторое отставание отечественных нейронаук от мировых происходит во многом благодаря слабой кооперации между молекулярно-биологическими и нейрофизиологическими лабораториями в нашей стране. В этой связи диссертационная работа М.Е.Матлашова представляется особенно актуальной.

Поддержание и регуляция внутриклеточного уровня кислотности важно для всех без исключения клеток организма, поскольку известно, что уровень рН влияет на активность множества мембранных каналов и ферментов. Изучение механизмов регуляции рН в нейронах приобретает особое значение потому, что в нервных клетках во многих случаях внутриклеточный рН тесно коррелирует с электрической активностью нервных клеток, а значит, может принимать участие в процессах переработки информации нервной системой. Для решения такой задачи чрезвычайно важна разработка неинвазивных методов исследования, позволяющих, однако, производить измерение изучаемой величины с достаточной точностью. Этой цели как нельзя лучше соответствуют генетически

кодируемые флуоресцентные зонды, разработке которых посвящена настоящая диссертационная работа. Представляется особенно интересным примененный автором подход, позволяющий селективно экспрессировать зонды в отдельных компартментах нейрона (пре- и постсинаптических), что дает возможность исследовать как меняется уровень кислотности в этих функционально различных областях нервной клетки, в частности, в процессе синаптической передачи.

Активные формы кислорода, как и другие свободные радикалы, играют важную роль в процессах, протекающих в нервных тканях, однако в подавляющем большинстве случаев рассматриваются как часть патофизиологического процесса, ведущего к нейродегенерации и старению. Однако в настоящее время стали накапливаться данные, свидетельствующие о том, что активные формы кислорода могут выполнять важные регуляторные функции в нервной системе, в частности, в процессах синаптической пластичности. В этой связи разработка инструментария, позволяющего проводить локальную стимуляцию выработки активных форм кислорода, позволит проводить детальное изучение роли этого типа внутриклеточного сигналинга в функции нейронов.

Таким образом, цели и задачи, поставленные автором в данной работе, являются, безусловно, актуальными.

Структура и объем диссертации

Работа М.Е.Матлашова построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, методического раздела, результатов исследования, совмещенных с их обсуждением, выводов, заключения, списка сокращений и списка цитированной литературы. Общий объем диссертации составляет 105 страниц, в списке литературы содержится 255 ссылок, работа проиллюстрирована 27 рисунками.

Во введении автор раскрывает актуальность проведенного исследования и подводит к постановке задачи. Затем в отдельной короткой главе по пунктам описываются цели и задачи исследования. 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 попалась даже явная ошибка, как например фраза о том, что «потенциал действия распространяется от дендритов к аксонам...» На самом деле все происходит с точностью до наоборот: потенциал действия в норме генерируется в начальном сегменте аксона и затем уже происходит его обратное распространение в дендриты. Однако это нисколько не умаляет значения сделанной автором работы по внедрению молекулярно-биологических методов в нейробиологию, а лишь указывает на некоторые шероховатости текст в области, не являющейся узкой специализацией автора.

Далее в обзоре литературы автор подробно описывает механизмы регуляции внутриклеточного рН и его влияние на процессы синаптической передачи.

Значительная часть обзора посвящена активным формам кислорода (АФК) и их роли в функционировании нейрона. Подробно рассматриваются ферментные системы, участвующие в генерации АФК, а также их роль в развитии различных нейродегенеративных заболеваний. Заканчивается обзор литературы описанием современных методов регистрации и активации метаболической и электрической активности нейронов. Таким образом, обзор литературы охватывает весь пласт научной информации, необходимый для того, чтобы представить актуальность диссертационной работы и современное состояние исследуемой проблемы.

Раздел «Материалы и методы» подробно описывает использованные в работе методические подходы. Стоит отметить широкий спектр использованных в работе современных методов – от молекулярно-биологических до методов клеточной нейрофизиологии. Среди них клонирование генетических векторов, первичная культура гиппокампальных нейронов и методы оптической регистрации. Все это свидетельствует о

высоком профессиональном уровне автора.

Результаты работы совмещены с обсуждением, что в данном случае делает более понятной логику работы и облегчает прочтение текста. Выводы работы четко сформулированы и вытекают из полученных в исследовании результатов.

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

Путем модификации индикатора SynHer автором был разработан новый генетически кодируемый ратиометрический рН-чувствительный индикатор с повышенной интенсивностью флуоресценции, что открывает возможность использования данного зонда в тканях мозга *in vivo*. Впервые была осуществлена регистрация изменения уровня рН в изолированных компартментах нервной клетки: в аксоне и дендритах. Выявлены существенные различия в динамике и амплитуде изменений кислотности среды в этих двух компартментах во время спонтанной сетевой активности в первичной гиппокампальной культуре нейронов.

Кроме того, на основе оксидазы D-аминокислот дрожжей *Rhodospiridium toruloides* автором был создан молекулярный инструмент для управляемой продукции пероксида водорода в отдельных компартментах нервной клетки. С помощью этого инструмента была продемонстрирована возможность локального управляемого изменения уровня пероксида водорода в аксоне нейрона. Было продемонстрировано, также, что продуцируемый в аксоне пероксид не достигает тела нейрона, что, возможно, связано с высоким уровнем активности антиоксидантных систем в нервной ткани.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в том, что в ней впервые было показана разная динамика изменения внутриклеточной кислотности в пре- и постсинаптических компартментах нейрона во время спонтанной сетевой активности. Кроме того впервые продемонстрирована

временная динамика диффузии пероксида водорода по аксону нейрона. Полученные данные существенно расширяют современные представления о степени изолированности биохимических процессов, протекающих в разных частях нервной клетки. Особенно стоит отметить практическую значимость работы. Не вызывает сомнений, что полученные автором генетические конструкции (зонды) как для регистрации внутриклеточного рН, так и для локальной продукции пероксида водорода, будут в дальнейшем использованы исследователями, работающими в области клеточной нейрофизиологии.

Степень обоснованности и достоверность полученных результатов, научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне и производит впечатление грамотного научного исследования. Полученные результаты хорошо проиллюстрированы и убедительно подтверждают сделанные автором выводы. Исследование проведено с использованием большого экспериментального материала, что обеспечивает достоверность полученных данных.

По материалам работы опубликовано три статьи в англоязычных журналах, входящих в основные мировые системы цитирования, что даже превышает требования ВАК к кандидатским диссертациям. Отдельные части работы докладывались на двух международных конференциях.

Автореферат и публикации соискателя в полной мере отражают ее наиболее существенные положения и выводы.

Несмотря на общее положительное впечатление от работы, у меня возникло несколько замечаний.

1. 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.

2. 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 (среднее, ошибки, N и, самое главное, достоверность). Строго говоря, если достоверность не посчитана, 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 компартментах. Эту разницу можно было бы формализовать путем несложной математической обработки, что, безусловно, украсило бы работу.

Однако отмеченные недостатки никаким образом не снижают актуальность и значимость проведенной автором работы, а лишь демонстрируют потенциальные возможности для ее улучшения.

Заключение

Диссертационная работа Матлашова Михаила Егоровича «Молекулярные инструменты для модуляции редокс-статуса и мониторинга активности нейронов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, является научно-квалификационной работой, в которой автор, используя молекулярно-биологические подходы, создал новые молекулярные инструменты для исследования клеточных механизмов различных аспектов функционирования нейрона. Более того, автору удалось с использованием созданных им инструментов получить новые данные об изменении состояния внутриклеточной среды нейронов. Безусловно, разработанные в диссертации методы и подходы найдут широкое применение в области клеточной и молекулярной нейробиологии.

По актуальности, методическому уровню, научной новизне и практической значимости работа соответствует требованиям пп. 9,10,11,13,14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. №842), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник лаборатории
клеточной нейробиологии обучения

ФГБУН Института высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии РАН, д.б.н.

А.Ю. Малышев

8 сентября 2014 г.



Подпись т.

УДОСТОВЕРЯЮ

Зав. канц. ИВНД и НФ

Малышева А.Ю.

Контактная информация:

Индекс, почтовый адрес: 117485, г.Москва, ул. Бутлерова, д. 5А

Телефон: +7(495)338-8500 доб. 2152

e-mail: malyshev@ihna.ru