

## 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 Матлашова М.Е. посвящена актуальной проблеме молекулярной и клеточной биологии – исследованию параметров внутриклеточной среды нейронов, в частности рН и продукции активных форм кислорода в норме при синаптической передаче и при моделировании патологических состояний. Данная проблема имеет большое фундаментальное значение для нейробиологии, а разработка новых сенсоров внутриклеточного рН и генетически кодируемых модуляторов редокс-статуса будут востребованы во многих областях биологии и медицины. Механизмы изменения рН и редокс-статуса клетки при нормальном функционировании нервных клеток остаются изученными не полностью, то же касается и роли активных форм кислорода и ряда других интермедиатов на развитие ряда нейродегенеративных патологий. Все это диктует необходимость глубоких экспериментальных исследований параметров внутриклеточной среды, как *in vivo* так и *in vitro*. Вторая затронутая в диссертационной работе проблема, касающаяся компартиментализации метаболических процессов в нервных синапсах, также представляет немалый интерес для широкого круга молекулярных и клеточных биологов. Однако, несмотря на имеющиеся в литературе данные о роли изменений рН и редокс-буферов в нейтральных клетках в норме и при патологиях, до последнего времени не было проведено всеобъемлющего исследования этих процессов, в первую очередь из-за

отсутствия адекватных инструментов исследования, специфичных к измеряемым параметрам и минимально влияющим на функции клетки. Именно задачи разработки и апробирования таких молекулярных инструментов и были поставлены и успешно решены в данной работе.

Следует отметить, что разработка молекулярных зондов на основе генетически кодируемых молекул-сенсоров представляет одну из наиболее активно развиваемых в последнее время проблем клеточной биологии. Очевидно, что при должной проработке всех аспектов функционирования таких белков, они со временем могут значительно потеснить традиционные флуорохромные зонды в арсенале фундаментальной науки.

Таким образом, поставленная автором цель работы является, несомненно, актуальной.

**Структура и объем диссертации.** Работа построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, методического раздела, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка литературных источников. Объем диссертации составляет 105 страниц, список литературы содержит 255 источников, работа проиллюстрирована 27 рисунками.

Во введении автор обосновывает актуальность исследования, его объект и цели, определяет научную новизну и практическую значимость работы.

Обзор литературы, охватывающий результаты классических и современных исследований, имеющих отношение к теме диссертации, в полной мере отражает современное состояние исследуемой проблематики. Автор приводит подробные данные о молекулярных механизмах синаптической передачи, влиянии рН на эти процессы, а также об изменениях внутриклеточного рН в нейронах при модуляции их электрической активности. Подробно рассмотрена как в целом биология различных активных форм кислорода так и их влияние на функционирование нейронов. При этом описывается участие АФК в синаптической передаче, и их роль при развитии различных неврологических патологий. Отдельно описаны различные методы мониторинга внутриклеточного рН и продукции

АФК, начиная с классических химических соединений-флуорохромов и заканчивая новыми генетически кодируемыми сенсорами. Все приведенные в обзоре литературы данные указывают на чрезвычайную важность и актуальность предпринятого исследования.

Методы исследования, использованные в представленной работе, такие как конфокальная микроскопия, широкий набор методов молекулярной биологии, а также трансфекция витальных срезов мозга указывают на высокий профессиональный уровень работы.

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

В работе Матлашова М.Е. впервые получен новый генетически кодируемый рациометрический индикатор кислотности внутриклеточной среды, позволяющий количественно измерять значение внутриклеточного рН и отличающийся высокой интенсивностью флуоресценции. При использовании этого индикатора автору удалось показать изменениями рН, составляющие около 0,1 единицы при развитии спонтанной синхронной активности нейронов в культуре. Интересно, что аналогичные изменения рН наблюдались и в клетках среза гиппокампа мыши, что позволяет предполагать, что наблюдаемые процессы действительно имеют место *in vivo*, а не являются особенностью культивируемых клеток.

Значительным достижением является разработка автором генетических конструкций с пре- и постсинаптической локализацией сенсора, что позволило показать, что динамика рН в этих компартментах различается, причём в постсинаптическом окончании амплитуда рН-колебаний практически вдвое выше, что указывает на высокую степень локализации метаболических процессов в нейронах.

Еще одним разработанным молекулярным инструментом стала конструкция для направленной контролируемой продукции пероксида водорода с использованием оксидазы D-аминокислот дрожжей *Rhodospiridium toruloides*, которая также была сделана в модификациях,



направляющих ее в разные компартменты нейрона. При этом было показано, что перекись водорода, продуцируемая в аксоне, не транспортируется в тело и дендриты того же нейрона, что говорит о высокой степени компартментализации сигнализации, связанной с АФК. Возможно, за счет различной активности антиоксидантных систем.

**Теоретическая и практическая значимость.** Впервые проведено глубокое исследование изменений рН и продукции перекиси водорода в нейронах при нормальном функционировании и при моделировании окислительного стресса. Несомненный теоретический интерес представляет обнаруженная компартментализация многих изменений в синапсах нейронов, а также отсутствие диффузии перекиси водорода из аксонов. Результаты данной работы дают в руки исследователей нейральной физиологии и всех клеточных биологов новый мощный инструмент мониторинга внутриклеточных параметров и будут, безусловно, востребованы фундаментальной наукой.

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

Примененные автором молекулярно-биологические и цитологические методы адекватны поставленным задачам. Работа выполнена на большом объеме экспериментального материала с использованием самых современных подходов молекулярной и клеточной биологии.

Представленные в работе результаты достоверны, сделанные выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными. Представленные в автореферате и публикациях Матлашова М.Е. результаты полностью отражают проведенные исследования.

Результаты работы изложены в 3 научных публикациях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ. Отдельные аспекты работы изложены и обсуждены на 2 российских и международных конференциях.

При знакомстве с представленным экспериментальным материалом

возникают небольшие вопросы и замечания, требующие дополнительных комментариев и разъяснений диссертанта:

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.

Следует отметить, однако, что эти вопросы не носят критического характера и не снижают общего впечатления от работы.

### **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, содержащей решение актуальной задачи – разработке молекулярных генетически кодируемых индикаторов для изучения нейрональной физиологии. Результаты исследования имеют большое значение для молекулярной биологии, биохимии и клеточной биологии.

По актуальности, 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.

Ведущий научный сотрудник  
лаборатории структуры и функции митохондрий  
ФГБОУ ВПО «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»,  
Научно-исследовательский институт  
физико-химической биологии  
имени А.Н. Белозерского  
доктор биологических наук

Плотников Егор Юрьевич

28 августа 2014 г.



Контактная информация:

Индекс, почтовый адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр.40, к.430

телефон: (495)9395944

E-mail: plotnikov@genebee.msu.ru