

Отзыв официального оппонента

о диссертации Абушик Полины Александровны на тему «Механизмы нейротоксичности, вызванной активацией рецепторов глутамата в центральных и периферических нейронах крыс», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук (специальность 03.03.01 – физиология)

Диссертация П. А. Абушик является фундаментальным исследованием, актуальность которого определяется важностью полученных результатов не только для физиологии, но и для практической медицины. П. А. Абушик впервые было показано, что динамика кальциевых ответов на каинат в нейронах центральной нервной системы (ЦНС) крыс определяется соотношением экспрессии Ca^{2+} -проницаемых и Ca^{2+} -непроницаемых АМПА рецепторов, что отражает функциональную специализацию нейронов коры мозга взрослых крыс. Результаты исследования позволили установить, что нейроны тригеминального ганглия крыс различаются по реакции на действие агонистов рецепторов глутамата. Этот факт является существенным дополнением к пониманию фундаментальных вопросов строения и функционирования подобных рецепторов. Учитывая, что в условиях гиперактивации различных типов рецепторов глутамата в нейронах могут развиваться нейродегенеративные процессы, связанные с нарушением Ca^{2+} регуляции, работа П. А. Абушик открывает новые перспективы для изучения патогенеза таких социально значимых неврологических заболеваний, как эпилепсия, ишемический инсульт, мигрень, боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона.

Диссертация изложена на 113 страницах машинописного текста, построена по традиционному плану: включает общую характеристику работы, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты экспериментов, обсуждение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 184 публикации. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 1 таблицей.

Актуальность работы диссертант объективно обосновал в разделе, где дал общую характеристику работы. Там же очень четко и логично сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

В разделе “Обзор литературы” диссертант подробно рассматривает современные литературные материалы по теме исследования, касающиеся строения и функции глутаматергического синапса, структурно-молекулярной организации рецепторов глутамата, нейротоксического действия глутамата и глутамат-индуцированной дисрегуляции кальциевого баланса клетки.

Обзор показывает хорошее знание автором работ по теме его исследования, умение анализировать и обобщать литературные материалы. Он послужил автору для обоснования

целей и задач исследования. В целом обзор оставляет очень приятное впечатление. Изложение материала проведено на высоком теоретическом уровне и свидетельствует о широкой эрудиции автора.

В главе, посвященной материалам и методам исследования, подробно описываются приготовление и идентификация первичных культур нейронов коры головного мозга и нейронов тригеминального ганглия крыс.

Приводится состав растворов, использованных в экспериментах. С необходимыми деталями описаны процедуры флуориметрической регистрации изменений концентрации внутриклеточного Ca^{2+} и флуориметрического определения митохондриального мембранного потенциала, регистрации ионных токов через плазматическую мембрану нейронов и управления программой эксперимента.

Из описания методов видно, что диссертант использовал самые современные подходы для своей работы, адекватные целям и задачам проведенного им исследования. Необходимо отметить высокий методический уровень проведенного исследования. Несомненно, что представленная работа могла быть выполнена только при сочетании отличного владения различными подходами современной микроскопии, а также электрофизиологическими методами регистрации ионных токов через плазматическую мембрану клеток, требующих высокого профессионализма экспериментатора и глубокого понимания особенностей как инструмента, так и объекта исследования.

Полученные автором экспериментальные данные, безусловно, являются приоритетными. Экспериментальная часть диссертации состоит из 4 разделов.

В разделе 3.1 впервые детально исследован состав рецепторов глутамата, в нейронах первичной культуры коры мозга крыс, обеспечивающих вход Ca^{2+} при действии агонистов. В результате было показано, что вариабельность Ca^{2+} ответов, вызванных активацией АМПА рецепторов, определяется не только различными механизмами входа ионов кальция в клетки, но и отражает гетерогенность популяции нейронов первичной культуры коры мозга крыс в отношении экспрессии Ca^{2+} -проницаемых и Ca^{2+} -непроницаемых АМПА рецепторов.

В разделе 3.2 изложены и обсуждены результаты экспериментов, направленных на исследование нейротоксического действия гомоцистеина (ГЦ) на нейроны первичной культуры коры мозга (ЦНС) крыс. В результате проделанной работы было установлено, что нейротоксичность ГЦ в этих нейронах реализуется через ионотропные рецепторы глутамата типа NMDA и мГлуР5. Нейротоксическое влияние предотвращается избирательными антагонистами этих рецепторов. Раздел 3.3 посвящен исследованию нейротоксического эффекта ГЦ на нейроны первичной культуры тригеминального ганглия крыс. Диссертант мотивирует такой подход тем, что нейротоксическое действие глутамата достаточно

подробно изучено на различных структурах ЦНС, однако известно, что большинство нейродегенеративных и неврологических состояний развивается не только в головном мозге, но и в периферической нервной системе (ПНС). В результате оказалось, что, как и в случае с нейронами в ЦНС, нейротоксический эффект ГЦ в клетках ПНС реализуется через ионотропные рецепторы глутамата NMDA и мГлуP5 типа. И, наконец, в разделе 3.4 была успешно предпринята попытка сравнения ответных реакций нейронов коры и тригеминального ганглия крыс на гомоцистеин, NMDA и глутамат. В результате оказалось, что механизм развития нейротоксического эффекта агонистов рецепторов глутамата в нейронах ЦНС и ПНС существенно не отличается и помимо кальциевой дисрегуляции включает в себя, дисфункцию митохондрий, приводящую к разобщению митохондриальной дыхательной цепи, запуску окислительного фосфорилирования, которое впоследствии может приводить к инициации гибели нейронов по механизму апоптоза.

Результаты обсуждены П. А. Абушик с привлечением современных литературных данных, на основании которых сделаны вполне обоснованные выводы.

Диссертация написана свободно, с интересом читается. Автореферат диссертации написан четко и логично. В результате его изучения можно получить достаточно полное представление о проделанной работе. Работа интересная как по логике проведения экспериментов, так и по изложению материала. К сожалению, в тексте иногда встречаются опечатки (см., например, стр. 6, 13, 21 и др.) или неудачные выражения (см., например, «Регистрация токов нейронов» на стр. 2 или «с использованием рациометрического красителя» на стр. 55). Эти замечания носят в основном редакционный характер и не умаляют общей высокой оценки работы.

Хотелось бы задать диссертанту 3 вопроса:

1. Электрофизиологические эксперименты выполнены в режиме отведения от целой клетки, т. е. с регистрацией интегральных токов. Учитывалось ли влияние последовательного сопротивления на точность измерений?
2. Очевидно, что регистрация унитарных токов через каналы могла бы быть более информативной для анализа действия тех или иных фармакологических агентов. Предпринимались ли попытки регистрации активности одиночных лигандуправляемых каналов?
3. Утверждение о том, что исследовались именно глутаматные рецепторы, основано исключительно на регистрации их функциональной активности в электрофизиологических или флуориметрических экспериментах. Диссертация могла бы быть еще более содержательной, если бы автор показал наличие канальных белков в плазматической мембране другими методами, например,

иммунофлуоресцентными. Предпринимались ли попытки использовать подобные методы?

У меня нет принципиальных замечаний ни по сути работы, ни по форме ее изложения. Возникавшие по ходу знакомства с диссертацией вопросы и соображения носят дискуссионный характер и ни в коей мере не снижают общего прекрасного впечатления от работы.

Диссертация имеет несомненное теоретическое и практическое значение для физиологии, клеточной биологии и медицины. Полученные автором приоритетные данные вносят существенный вклад в понимание механизмов функционирования глутаматных рецепторов, а также в выяснение их роли в процессах патогенеза социально значимых неврологических заболеваний.

Основные результаты и выводы диссертации отражены в 4 публикациях в рецензируемых журналах, в автореферате и в 10 тезисах и могут быть использованы в научно-исследовательской работе таких учреждений как ИНФ РАН, ИНЦ РАН, ИЭМ РАМН, ИБК РАН, ИВНД и НФ РАН и др., в том числе при чтении курсов лекций по нейрофизиологии для биологических и медицинских факультетов ряда университетов.

Заключение: по актуальности темы, объему выполненной экспериментальной работы, методическому мастерству, достоверности и обоснованности сделанных выводов, а также новизне, теоретической и практической значимости результатов диссертация Абушик Полины Александровны «Механизмы нейротоксичности, вызванной активацией рецепторов глутамата в центральных и периферических нейронах крыс» полностью соответствует всем требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 - физиология, а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени.

Заведующий Лабораторией ионных механизмов клеточной сигнализации
Института цитологии РАН, доктор биологических наук

Ю.А. Негуляев

22 мая 2014 г.

