

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Большакова Артема Евгеньевича на тему: «Механизмы нейропротекторного действия убаина при эксайтотоксическом стрессе в нейронах неокортекса крыс», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.5. Физиология человека и животных

Исследование функциональных свойств, структурной организации и механизмов блокады различных белковых комплексов плазматической мембраны (ионных каналов, переносчиков и помп), определяющих ионный гомеостаз клетки, несомненно, весьма значимая задача современной физиологии. Хорошо известно, что нарушение их работы, приводит к сбою жизненно важных клеточных процессов, что, в свою очередь, проявляется на организменном уровне в виде тяжелых заболеваний.

Кальциевая передача сигналов объединяет мембранную возбудимость и биологическую функцию нейронов. Действуя на границе между «электрическим» и «сигнальным» мирами клетки, Ca^{2+} каналы играют ведущую роль во многих ключевых аспектах нейронной функции. Вследствие огромной важности кальция как вторичного посредника, нейроны используют многочисленные способы управления внутриклеточным содержанием Ca^{2+} , чаще всего в пределах местных микродоменов. Из-за чрезвычайной чувствительности нейронов к изменению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , даже относительно небольшие отклонения в Ca^{2+} сигнализации могут привести к разрушительным последствиям. Выявление новых модуляторов кальциевого сигнала в нейронах, в частности среди эндогенных молекул, важно как для понимания функционирования нервной системы в целом, так и для разработки новых лекарственных препаратов.

Диссертационная работа А.Е. Большакова представляет именно такое комплексное направление. Автор детально исследовал эффекты субнанолярных концентраций убаина при нейротоксическом воздействии агонистов рецепторов глутамата, при этом показав, что именно путь апоптоза превалирует при долговременном нейротоксическом воздействии на рецепторы. Автор выявил, что присутствие как 0.1 нМ, так и 1 нМ убаина приводит к увеличению числа живых и уменьшению количества апоптотических нейронов в первичной культуре. Данный результат был подкреплен данными по исследованию уровня экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2. Было показано, что субнанолярные концентрации убаина предотвращают снижение уровня Bcl-2 в ответ на эксайтотоксический стресс. Поскольку общепринято, что первой реакцией нейрона на высокие концентрации глутамата является дестабилизация кальциевого гомеостаза, что в итоге приводит к октрыванию митохондриальных пор и развитию апоптоза, А.Е. Большаков исследовал влияние убаина на концентрацию внутриклеточного свободного кальция при действии агонистов рецепторов глутамата. Используя флуоресцентные измерения, автор показал, что убаин в нанолярных концентрациях оказывает существенное регуляторное воздействие на Ca^{2+} сигнал, вызванный аппликацией насыщающих концентраций агониста рецепторов глутамата, приводя его к состоянию близкому к норме. Экспериментально исключив возможность изменения свойств рецептора глутамата под действием убаина, диссертант предположил, что реципиентом регуляторного действия Na^{+}/K^{+} -АТФазы в нейронах при антиапоптотическом действии убаина может являться Na^{+}/Ca^{2+} -обменник плазматической мембраны. Эксперименты подтвердили это предположение. Ингибиторный анализ показал, что в

условиях эксайтотоксического стресса добавление 1 нМ убаина заставляет усиленно работать обменник в прямом режиме, удаляя Ca^{2+} из клетки.

Таким образом, в ходе выполнения диссертационной работы по изучению действия наномолярных концентраций убаина на нейроны коры головного мозга крыс, было доказано, что механизм его антиапоптоического действия имеет бифазный характер: быстрый, заключающийся в предотвращении переполнения клетки кальцием и медленный, определяющийся нормализацией экспрессии антиапоптотических факторов.

Раздел «Материалы и методы» свидетельствует о том, что работа выполнена на современном методическом уровне. Эксперименты проводились как при помощи метода локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка», самого тонкого и адекватного метода, применяемого для решения поставленных задач, так и с использованием флуоресцентного подхода для оценки динамики изменения внутриклеточной концентрации кальция. Также были использованы методы молекулярной биологии – иммуноцитохимия и витальный тест с использованием конфокальной микроскопии.

Достоверность полученных результатов, не вызывает сомнений. Иллюстрации наглядны и обладают высоким качеством. Полученные данные всесторонне обсуждены с привлечением большого числа работ.

Выводы диссертации четко сформулированы и соответствуют представленному экспериментальному материалу.

Результаты работы широко и полно опубликованы в 1-ой зарубежной, 3-х российских статьях и 10-ти тезисных сообщениях.

Работа в целом написана хорошим языком, с малым количеством опечаток и стилистических погрешностей.

Полученные результаты могут быть использованы при чтении курсов лекций на биологических и медицинских факультетах университетов.

Однако при знакомстве с диссертацией возник ряд замечаний и вопросов:

- 1) Список цитированной литературы представлен не самыми свежими работами, что обидно, поскольку автор очень вдумчиво использует литературные данные и было бы интересно ознакомиться с самым современным состоянием вопроса.
- 2) Встречаются не вполне корректные высказывания, например «Влияние убаина на проводимость или параметры активации каналов NMDA и AMPA/KA-рецепторов можно проверить и оценить по действию вещества на их ВАХ.» Убаин может действовать на функционирование канала и соответственно изменять ВАХ, но не может действовать на ВАХ.
- 3) Что заставляет $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -обменник работать в усиленном режиме при действии 1 нМ убаина? Изменяется его чувствительность к кальцию? Если да, то за счет чего? Конформационные изменения?

Диссертация Большакова Артема Евгеньевича на тему: «Механизмы нейропротекторного действия убаина при эксайтотоксическом стрессе в нейронах неокортекса крыс» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Большаков Артем Евгеньевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.5. Физиология человека и животных. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не обнаружены.

Член диссертационного совета

Д.б.н., зав отделом Молекулярной

физиологии клетки ИНЦ РАН

Казначеева Е.В

23.09.2022

Подпись руки Казначеевой Е.В.
23.09.2022г.
..... канцелярией
Балагурова Н.В.