

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Мухиной Ирины Васильевны на диссертационную работу Хайтина Андрея Михайловича на тему: «Участие ионов кальция в выживании и смерти нейронов и глиальных клеток после аксотомии»

по специальности 03.01.02 – Биофизика,  
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук 3 июня 2021 г. в диссертационном совете Д 212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394036, Воронеж, Университетская пл., 1

### **Актуальность темы выполненной диссертационной работы**

Диссертационная работа Хайтина А.М. посвящена актуальному вопросу биологии, в частности нейрон-глиальным взаимодействиям в нервной системе. Известно, что глия выполняет не только трофическую, поддерживающую и изолирующую функции, но и принимает участие в модуляции синаптической эффективности передачи информации в нейронных сетях. В некоторых случаях изменения свойств глии могут приводить к изменению работы нейронов и даже их гибели. Несмотря на накопленные данные о молекулярно-клеточных и структурных изменениях функционального состояния глии при различных воздействиях на нервную систему, причины, основные условия и механизмы возникновения гибели глиальных клеток в отдаленном участке от места повреждения нерва остаются всё ещё мало изученными. Важно отметить, что возникшие в посттравматическом периоде нарушения электрической активности нервной клетки могут быть вызваны нарушением работы глиальных клеток. Отсюда следует, что в борьбе с посттравматическими осложнениями, связанными со сниженной регенеративной активностью нейрона, восстанавливающего аксональный рост в месте повреждения, должна быть разработана система предотвращения нарушения активности и жизнеспособности прежде всего глиальных клеток, окружающих нейрон.

Кроме того, многочисленные наблюдения в эксперименте показывают, что одним из возможных посредников между клеточно-молекулярными событиями в месте повреждения участка нервной ткани является  $Ca^{2+}$ , ключевой элемент многих сигнальных путей, управляющих клеточным гомеостазом. Однако конкретная роль  $Ca^{2+}$  в выживании и гибели глиальных клеток, расположенных удаленно от места повреждения нерва остается невыясненной. Все эти вопросы легли в основу цели научной работы диссертанта, которая была сформулирована следующим образом: изучить  $Ca^{2+}$ -зависимые сигнальные механизмы реакции нейронов и окружающих их глиальных клеток на повреждение, вызванное аксотомией.

В качестве объективного метода, выявляющего механизмы возникновения изменения метаболизма в отдаленных клетках глии от места повреждения, был разработан новый метод экспериментального

моделирования *in vitro* (препарат рецептора растяжения рака с сохранением связи между ним и ганглием вентральной нервной цепочки), выбраны адекватные методы оценки активности нейрона – электрофизиологические, глии – флуоресцентные (Са-имиджинг), а также фармакологические методы анализа механизмов клеточной гибели на уровне транспортных механизмов и внутриклеточных сигнальных белков.

#### **Степень обоснованности, достоверности научных результатов**

Научные положения диссертационной работы обоснованы большим количеством и разнообразием методов исследования. Положения и выводы диссертационной работы сформулированы на основе полученных результатов и отвечают поставленным задачам, а исследование соответствует паспорту специальности биофизика в области изучения биофизики клетки, а именно механизмов регуляции ионом кальция процессов гибели клеток с использованием электрофизиологических и флуоресцентных методов исследования.

Текст автореферата изложен в хорошем стиле, свидетельствует о высокой квалификации автора и соответствует содержанию диссертационной работы. Замечаний к содержанию автореферата, снижающих научную и практическую значимость работы, не выявлено. К недостатку можно отнести присутствие в списке публикаций основных статей по диссертации тезисов, опубликованных в высокорейтинговых журналах.

Основные результаты диссертации представлены в 25 печатных работах в журналах, включенных в системы цитирования Web of Science и Scopus, из них 3 полнотекстовые статьи, полностью отражающие результаты диссертационного исследования. Не вызывает сомнений личный вклад автора в планирование, выполнение исследований, обработку материала, анализ и написание статей.

#### **Научная новизна, теоретическое и научно-практическое значение диссертационного исследования**

Автором диссертационного исследования вынесены на защиту следующие основные положения: (1) аксотомия ускоряет функциональную инактивацию нейронов и стимулирует смерть сателлитной глии вдали от места повреждения, ионы  $Ca^{2+}$  играют в этом существенную роль; (2) аксотомия вызывает повышение концентрации  $Ca^{2+}$  в нейроне и его сателлитной глии вдали от места повреждения; (3) при аксотомии повышение внеклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  стимулирует апоптоз удаленной глии, но защищает ее от некроза; (4) повышение концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле стимулирует некроз и апоптоз удаленной глии, а также, в том числе при входе ионов  $Ca^{2+}$  через  $Ca^{2+}$  каналы плазмалеммы, ускоряет функциональную инактивацию нейронов; (5) при аксотомии высокопроницаемые поры митохондрий поддерживают функциональную активность нейрона, работа  $Ca^{2+}$ -АТФазы эндоплазматического ретикулума защищает глию от апоптоза и некроза, риаудиновые рецепторы защищают глию от апоптоза, но усиливают ее некроз; (6) при аксотомии кальций-зависимые  $K^{+}$  каналы и протеинкиназа С защищают удаленную глию от апоптоза, однако протеинкиназа С и

кальмодулинкиназа II участвуют в некрозе глии. В отношении представления положений следует отметить, что автор слишком детально сформулировал основные положения, что не позволяет выделить главную составляющую новизны работы.

Для доказательства данных положений автором были получены следующие новые методы, новые факты и разработаны гипотезы: (1) впервые была разработана экспериментальная модель *in vitro* для изучения нейрон-глиальных взаимодействий в нерве - препарат рецептора растяжения рака с сохранением связи между ним и ганглием вентральной нервной цепочки; (2) впервые проведены исследования уровня кальция в отдаленной от места повреждения глии и показано, что аксотомия повышает уровень  $Ca^{2+}$  и стимулирует некроз и апоптоз глии, которые регулируются внеклеточным  $Ca^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ -АТФазой эндоплазматического ретикулума (SERCA), а также риаудиновыми рецепторами, протеинкиназой С и кальмодулинкиназой-II; (3) выдвинута гипотеза о роли кальциевого гомеостаза в нейроне и в удаленной от места повреждения глие в цитопротекции и разработке новых подходов к лечению последствий нейротравм, а также о важном значении контроля внеклеточной среды для выживания глиальных клеток.

Результаты исследования расширяют представления о физиологических механизмах переключения апоптоза/некроза клеток при нейротравме. Уточнены сведения о роли  $Ca^{2+}$  в нейронах и сателлитной глии вдали от места аксотомии.

С практической точки зрения, полученные данные могут быть использованы при разработке новых подходов к лечению последствий нейротравм. Блокирование  $Ca^{2+}$  каналов плазматической мембраны нейрона может повысить устойчивость к повреждению, а активизация кальциевой АТФазы эндоплазматического ретикулума и ингибирование кальмодулин-зависимой киназы II могут снизить некроз и апоптоз глиальных клеток.

Теоретические положения исследования могут быть использованы в научных исследованиях, в процессе обучения студентов биологических, медицинских и фармацевтических вузов.

#### **Оценка объема, структуры и содержания работы**

*Диссертация традиционно изложена* на 156 страницах машинописного текста, состоит из введения, 8 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований, обсуждение полученных результатов), заключения, выводов и библиографического указателя, включающего 206 отечественных и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 38 рисунками и 7 таблицами.

*Обзор литературы* изложен на 45 страницах диссертации и представлен основными сведениями о моделях аксотомии, клеточных изменениях, в том числе глии, вызываемые аксотомией, сигнальных механизмах, участвующих в реакции нейронов и глии на аксотомию, а также механизмах смерти нейронов и глии при аксотомии. Обзор литературы написан грамотно, данные представлены в логической цепочке, позволяющей сделать наиболее полное

заключение о состоянии проблемы в науке по выбранному направлению, что демонстрирует эрудицию автора в изучаемой проблеме.

*Материалы и методы исследования.* Описание методов очень подробное, особенно в части разработки нового препарата рецептора растяжения рака с сохранением связи между ним и ганглием вентральной нервной цепочки, и включало описание регистрации импульсной активности нейрона, флуоресцентное измерение вызванной аксотомией кальциевой динамики в МРН и клетках проксимальной сателлитной глии, флуоресцентную визуализацию и оценку уровня смерти глиальных клеток, фармакологический анализ механизмов смерти клеток глии после аксотомии. Небольшое замечание касается слишком краткого описания -метода ингибиторного анализа Са-зависимых механизмов гибели клеток глии. Жаль, что автор не выделил специальную главу по статистическим методам обработки полученных данных. Сведения о статистике представлены очень поверхностно и не позволяют оценить их выбор в каждом конкретном случае.

*Результаты и их обсуждение.* Автором очень детально и логически представлены результаты исследования в 5-х экспериментальных главах, которые имеют четкую структуру: небольшое введение в качестве предполагаемой гипотезы, которую автор доказывает или опровергает в последующих исследованиях. В конце каждой подглавки есть небольшое заключение по полученным результатам. Автором проведен статистический анализ полученных результатов с использованием, вероятно, различных методов оценки достоверности различий. Однако по тексту не понятно, проводили ли множественное сравнение и какие критерии использовали при оценке значимости различий.

Автором четко доказано, что применение экспериментальной модели рецептора растяжения рака с сохранением связи между ним и ганглием вентральной нервной цепочки *in vitro* позволяет эффективно изучать механизмы клеточной смерти отдаленной глии и функции аксотомированного нейрона с использованием электрофизиологических и оптических методов оценки жизнеспособности клеток.

Результаты проведенных экспериментов указывают на то, что повышение уровня  $Ca^{2+}$  в цитозоле является основным фактором индуцированного аксотомией ускорения прекращения импульсной активности нейронов, которое обусловлено в первую очередь входом  $Ca^{2+}$  через потенциалзависимые каналы плазмалеммы.

Также оказалось, что  $[Ca^{2+}]_o$  является фактором, защищающим эти клетки от некроза, но стимулирующим апоптоз. Автором выдвинута гипотеза о том, что противонекротическое действие  $[Ca^{2+}]_o$  побуждало некоторые клетки с нарушенным в результате аксотомии гомеостазом переходить на апоптотический сценарий смерти.

Кроме того, полученные данные свидетельствуют о критически важной роли входа  $Ca^{2+}$  в цитозоль в смерти глиальных клеток при аксотомии, а наиболее существенным защитным механизмом является работа  $Ca^{2+}$ -АТФазы эндоплазматического ретикулума. Важную проапоптотическую роль играют

повышение уровня внеклеточного  $Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ -зависимые калиевые каналы и протеинкиназа С. В сценарий некротической смерти клеток при аксотомии вовлечены также риадиноновые рецепторы, протеинкиназа С и кальмодулинкиназа II, а снижение внеклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  сдерживает этот сценарий.

На основании данных, полученных в рамках диссертационного исследования, была сформулирована концепция о том, что характер импульсации периферического нейрона и электрофизиологического ответа на повреждение аксона зависит от глиальной оболочки. Буфер, который глия создает между плазматической мембраной и внеклеточной средой, предположительно, снижает участие каналов, задействованных в генерации потенциала действия, в ответе нейрона на повреждение аксона. А сохранение активности и жизнеспособности глии зависит от  $Ca^{2+}$  гомеостаза.

В целом в описании результатов прослеживается логика изложения, написано грамотно.

Автор, обсуждая результаты в Главе 8 и делая выводы, предлагал гипотезы с использованием большого количества цитируемой литературы, что позволило ему выдвинуть ряд предположений и выводов, логически вытекающих из собственных данных и данных литературы. В конце обсуждения результатов автор демонстрирует схему участия ионов  $Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  каналов и белков  $Ca^{2+}$ -зависимого пути в смерти или выживании клеток после аксотомии на основе полученных экспериментальных данных, а также определяет перспективные направления для дальнейших исследований участия кальциевых механизмов в ответе нейронов и глии на аксотомию.

*Заключение.* В конце диссертационной работы автор делает короткое заключение, позволяющее сжато представить обсужденные результаты.

*Выводы.* По результатам диссертационной работы автором было сделано 5 выводов. В целом выводы соответствуют поставленным 4-м задачам. Отсутствует вывод по первой задаче.

По тексту диссертации и изложения материала имеется ряд замечаний, которые изложены в отзыве по мере их встречаемости, однако замечания не имеют критического значения при оценке значимости достигнутых результатов в диссертационной работе Хаитина А.М.

#### **Вопросы:**


1. Можно ли перенести выявленные закономерности поведения глиальной оболочки механорецептора рака при аксотомии на реакцию глиальных клеток периферических нервов теплокровных животных с учетом разницы в метаболизме, температурном режиме и морфологии?
2. Можно ли использовать разработанную модель механорецептора рака для доклинических исследований нейропротекторных фармакологических препаратов?


#### **Заключение:**

Диссертационная работа Хайтина Андрея Михайловича на тему: «Участие ионов кальция в выживании и смерти нейронов и глиальных клеток

после аксотомии», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором исследований разработаны новые теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как значимое научное достижение. По актуальности, достоверности результатов, опубликованных в рецензируемых международных журналах, степени обоснованности научных положений и выводов диссертационная работа соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Хайтин Андрей Михайлович достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

30 апреля 2021

Доктор биологических наук, профессор  
кафедры нейротехнологий Института  
биологии и биомедицины федерального  
государственного автономного  
образовательного учреждения высшего  
образования «Национальный исследовательский  
Нижегородский государственный  
университет им. Н.И. Лобачевского»  Мухина И.В.  
603022, г. Нижний Новгород,  
пр. Гагарина, 23.  
Тел. 8(904)797 55 50  
e-mail [mukhinaiv@mail.ru](mailto:mukhinaiv@mail.ru)  
Сайт организации: <http://www.unn.ru/site/>

Подпись Мухиной И.В. заверяю  
Ученый секретарь федерального государственного  
автономного образовательного учреждения высшего  
образования «Национальный исследовательский  
Нижегородский государственный университет  
им. Н.И. Лобачевского»  Черноморская Л.Ю.