

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации Хайтина А.М. «УЧАСТИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ВЫЖИВАНИИ И СМЕРТИ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ АКСОТОМИИ», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

### **Актуальность темы выполненной работы**

Диссертационная работа Андрея Михайловича Хайтина посвящена изучению молекулярно-клеточных механизмов, развивающихся в нейронах после механической травмы, разрушающей целостность аксона. Безусловная актуальность исследований в этом направлении обусловлена тем, что подобные повреждения типичны при травмах головного и спинного мозга, а также является характерным патологическим состоянием после проведения нейрохирургических операций. Предотвращение гибели поврежденного нейрона или, по крайней мере, перевод этого события в русло программированной гибели (апоптоза) невозможен без детального исследования процессов, происходящих в поврежденном нейроне.

В последнее время становится все более очевидным, что отмеченные процессы являются не только внутриклеточными, но и отражаются на состоянии клеток, как прилегающих к поврежденному нейрону, так и находящихся на расстояниях, сопоставимых с размерами нейритов (аксонов и дендритов). В мозге и даже в его простейшей двумерной модели, такой как первичная нейроглиальная культура, нейрональная сеть чрезвычайно сложна и включает нейриты множества нейронов и отростки глиальных клеток. Поэтому для прояснения проблемы нейроглиальных взаимодействий в норме и патологии очень важно выбрать «минимальную» модель, в которой можно четко различить нейрон и окружающие его глиальные клетки. В исследовании А.М. Хайтина такой биологической моделью послужил механорецепторный нейрон (МРН) и окружающие его многочисленные глиальные клетки, служащие в совокупности абдоминальным рецептором растяжения речного рака. Актуальность и продуктивность этой модели для изучения разнообразных аспектов функционирования нейроглиального комплекса была многократно подтверждена исследователями школы профессора Андрея Борисовича Узденского и еще раз продемонстрирована в диссертационной работе Андрея Михайловича Хайтина.

## **Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, для науки и практики**

Научная новизна диссертационной работы Андрея Михайловича заключается в том, что в ходе данного исследования ему удалось усовершенствовать методику выделения механорецептора рака, несмотря на то, что этот биологический объект уже успешно использовали в коллективе диссертанта. Это позволило впервые провести измерения относительных изменений внутриклеточной концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) как в самом МРН, так и в окружающей его глии. Повышение качества измерений  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  впервые позволило выявить влияние ингибиторов ионных каналов,  $\text{Ca}^{2+}$ -насосов плазмалеммы и эндоплазматического ретикулума, а также некоторых  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых белков-регуляторов гомеостаза клеток. Впервые показано, что уровень  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  влияет на импульсную активность препаратов МРН, использованную А.М. Хайтиным в качестве основной характеристики функциональной активности объекта исследования.

Диссертант продолжил исследования коллектива А.Б. Узденского по выяснению факторов, влияющих на выживание МРН и окружающей его глии после аксотомии. Расширение списка этих факторов до регуляторов кальциевого гомеостаза безусловно имеет практическую значимость для будущих экспериментальных и теоретических исследований нейроглиальных взаимодействий в норме и при патологии, а также может внести вклад в развитие новых методов и приемов терапии при механической травме головного или спинного мозга, сопровождаемой нарушением целостности аксонов.

## **Структура диссертации и автореферата**

Диссертационная работа Андрея Михайловича Хайтина изложена на 156 страницах машинописного текста, состоит из Введения, Обзора литературы, Экспериментальной части, включающей Материалы и методы и Результаты исследований, Обсуждения результатов, Заключение и Выводов. Завершает текст диссертации список использованных источников (206 источников, из которых 15 принадлежит отечественным специалистам, в основном группы А.Б.Узденского). Иллюстративный материал включает 38 рисунков и 7 таблиц. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертационной работы. Реферат написан достаточно ясным языком, хорошо иллюстрирован и подытожен концептуальной схемой, обобщающей полученные результаты.

Во Введении обоснована актуальность исследования, формулируется цель и задачи работы, новизна и научно-практическая ценность полученных результатов. Представлены положения, выносимые на защиту.

В **Обзоре литературы** В списке цитированной литературы 206 наименований, из них 59 (почти 30%) относятся к периоду выполнения диссертационного исследования, если судить по дате публикации первых тезисов в 2013-2015 гг. Это высокий процент, подчеркивающий внимание автора к новациям в области диссертационного исследования.

Обзор состоит из нескольких глав, которые можно охарактеризовать следующим образом:

1. Описание объекта исследования в историческом и методическом плане; применение аксотомии, как способа создания контролируемой патологии.
2. Изменения в внутриклеточного гомеостазе нейронов, а также глии при механическом повреждении, в частности аксотомии.
3. Изменения внутриклеточной сигнализации с упором на изменения  $[Ca^{2+}]_i$  при аксотомии.
4. Последствия аксотомии для выживания нейронов, в том числе нейронов рака, и глии с детализацией роли некроза и программируемой гибели (апоптоза). В отдельном интересном параграфе рассмотрены способы протекции и регенерации и процессы при этом происходящие.

Отличием от традиционного построения Обзоров литературы в диссертациях является отсутствие иллюстраций, позаимствованных из цитируемых источников. Отчасти это обусловлено высокой плотностью информации, представленной в Обзоре, отчасти тем, что диссертант предпочел не заимствовать иллюстрации, а завершить Обзор обобщающей схемой. На ней А.М. Хайтин представил роль глии во взаимодействии с нейроном при аксотомии и значение кальциевого сигналинга в гибели и выживании поврежденного нейрона. Финальное обобщение всего цитированного материала, безусловно, повышает качество выполненного анализа литературы.

В целом, Обзор литературы оставляет впечатление качественной главы вполне применимой в методическом пособии для студентов медико-биологических факультетов или отдельной главы в научной монографии.

Глава **Материалы и Методы исследования** очень подробно иллюстрирована, что позволяет составить детальное впечатление о схемах экспериментов и протоколах выполнения. Это не только дает возможность воспроизвести проводимые автором эксперименты, но даже использовать методические наработки по приготовлению препаратов рецептора растяжения рака для проведения практических занятий со студентами. Основным методом тестирования функциональной активности препарата было измерение электрической импульсации МРН в состоянии покоя и в ответ на растяжение

рецепторной мышцы. Функционально активные препараты были способны генерировать спайки в течение часов, что свидетельствует об экспериментальном мастерстве диссертанта. Активные препараты затем использовали в экспериментах по измерению изменений  $[Ca^{2+}]_i$  с помощью флуоресцентных индикаторов и тестированию влияния ингибиторов на кальциевый сигналинг. Другой значительной частью работы, в которой также использовали метод флуоресцентной микроскопии, было измерение гибели нейронов и глии в результате аксотомии: Автор применил два ядерных красителя (Hoechst 33342 и йодид пропидия) и, сопоставляя распределение этих ядерных зондов, делал подсчеты клеток погибших в результате апоптоза или некроза. Использованные методы адекватны поставленным экспериментальным задачам. Некоторые вопросы, связанные с особенностью применения  $Ca^{2+}$  индикаторов и обсчета результатов измерений, приведены в разделе «Замечания» настоящего отзыва.

Статистическая обработка результатов убеждает в их достоверности и высоком научно-методическом уровне диссертационного исследования.

**Результаты** представлены в третьем разделе диссертации и разделены на главы, примерно соответствующие использованным методам исследования. Все данные в каждой главе наглядно иллюстрированы рисунками или суммированы в таблицах. К достоинствам оформления работы можно отнести и то, что автор в **Заключении** предлагает наглядную схему, показывающую изменения внутриклеточного сигналинга, происходящие в механорецепторном нейроне и в окружающей глии в результате аксотомии. Основным параметром, интересовавшим А.М. Хайтина и поэтому вынесенным в заголовок диссертационной работы, было изменение  $[Ca^{2+}]_i$  в результате аксотомии и влияние ингибиторов транспорта  $Ca^{2+}$ , а также  $Ca^{2+}$ -зависимых ферментов на указанные изменения. Неожиданным наблюдением, с нашей точки зрения, явилось то, что момент нарушения целостности аксона не вызвал скачка  $[Ca^{2+}]_i$ , как это происходит при механической травме нейрональной культуры. Более того, рост  $[Ca^{2+}]_i$  в области перикариона развивается раньше, чем в аксональном холмике, который морфологически расположен ближе к месту нарушения целостности аксона. Автору, по-видимому, предстоит выяснить в будущих исследованиях является ли это уникальным свойством МРН или это особенностью методики измерения, в частности выбора  $Ca^{2+}$  индикаторов. В качестве пожелания в этой части исследований можно отметить, что потенциально использованная флуоресцентно-микроскопическая система позволяла А.М. Хайтину провести измерения митохондриального потенциала. Этот параметр чрезвычайно важен, т.к. процессы гибели клеток и их шанс на репарацию зависят от

энергетического обеспечения этих процессов, решающую роль в которых принадлежит митохондриям.

Измерения  $[Ca^{2+}]_i$  и влияние модуляторов активности каналов и некоторых протеинкиназ на изменения  $[Ca^{2+}]_i$  после аксотомии обобщены в таблицах и показали сложный, иногда противоположно направленный характер механизмов гибели нейронов и глии. Очевидно, даже такая относительно простая модельная система, содержащая 1-2 нейрона, требует дальнейших исследований и более детального описания процессов и задействованных в них ферментов, внутриклеточных органелл и, возможно, изучения состава секретома (экзоцитома) этой клеточной системы.

### **Освещение диссертации в научной печати**

Результаты диссертационного исследования Андрея Михайловича Хайтина доложены на российских и международных конференциях, а также освещены в центральной печати в виде 25 работ, в том числе 10 публикаций в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, 6 из которых в рецензируемых журналах, входящих в международные базы Web of Science и Scopus.

**Выводы** диссертации соответствуют целям и задачам исследования, обоснованы фактическим материалом работы.

### **Замечания по диссертации**

1. Раздел 8.5, стр. 121. Сказано: «...пассивный транспорт  $Ca^{2+}$  в цитозоль по направлению градиента концентрации из мест с его более высоким содержанием – внеклеточной среды, эндоплазматического ретикулума и митохондрий. Автор не учитывает, что двухзарядные катионы электрофоретически «затягиваются» в цитозоль по каналам в плазматической мембране согласно трансмембранному нернстовскому потенциалу 60-70 мВ. Этого потенциала достаточно для создания 100-кратного превышения  $[Ca^{2+}]_i$  по сравнению  $[Ca^{2+}]$  в буфере.
2. Стр. 122 «...некоторые каналы пассивного транспорта могут закрываться в ответ на повышение входа  $Ca^{2+}$  внутрь клетки, например, митохондриальный кальциевый унипортер (MCU).» Нам не известно описание подобного феномена и А.М.Хайтин также не приводит ссылок. Напротив, давно показано (Favaron M., Bernardi P., 1985; Pradhan RK et al, 2011), что повышение  $[Ca^{2+}]_i > 1$  мкМ снимает магниевую блокаду  $Ca^{2+}$  унипортера, благодаря чему становится возможен захват  $Ca^{2+}$  митохондриями.
3. **Методы исследования.** Стр.78. Сказано: «Интенсивность флуоресценции в цитозоле нейрона и глии ( $I_g$ ) после вычитания из нее фоновой

флуоресценции ( $I_b$ ) показывала средний уровень содержания  $Ca^{2+}$  в соответствующих локациях препарата.» В действительности, Интенсивность флуоресценции одноволновых индикаторов  $Ca^{2+}$  в том числе Fluo-4 и Calcium Orange, нелинейно зависит от концентрации  $Ca^{2+}$  (Tsien et al, 1982). Поэтому более корректно писать, что интенсивность флуоресценции Fluo-4 (Calcium Orange) пропорциональна  $[Ca^{2+}]_i$ . К сожалению, А.М.Хайтин не приводит в диссертационной работе значения интенсивности, которые имели индикаторы в присутствии калибровочного ионофора иономицина. Возможно, поэтому возникает неожиданный феномен, что рост  $[Ca^{2+}]_i$  в глиальных клетках превышает изменения в нейроне, хотя механической травме подвержен именно нейрон, а не глиальные клетки, тем более удаленные.

4. В автореферате есть ссылка на работу (Abramov et al, 2007), тогда как в самой диссертации, включая список цитированной литературы, такой работы не упомянуто. В статье (Abramov et al, 2007) не говорится о методике загрузки клеток Fluo-4 или Calcium Orange. Возможно, по этой причине в разделах «Методы» автореферата и диссертации имеется расхождение в описании химических форм, которые использованы для загрузки клеток (в автореферате указаны сами индикаторы, а в диссертации их мембранопроницаемые ацетоксиметилловые эфиры).
5. Глава Результаты. Рисунки 32, 33, 34 демонстрируют плавный рост  $[Ca^{2+}]_i$  после перерезания аксона, однако не показано насколько ингибиторы ионных каналов и некоторых белков модулируют изменения  $[Ca^{2+}]_i$ . В результате эти данные приведены в таблицах (Табл. 1 автореферата и табл. 2 диссертации) только в виде разнонаправленных стрелок без количественной оценки, что обеднило информативность полученных результатов. В подписях к рисункам и тексте не указаны моменты перерезания аксона.
6. Не понятно почему апоптоз выражен в условных единицах, а некроз в процентах, хотя в обоих случаях использовано флуоресцентное окрашивание и подсчет клеточных ядер. Такой прием усложняет сопоставление эффектов.

Считаю необходимым отметить, что перечисленные выше замечания носят чисто технический характер, являются скорее советами по улучшению, чем констатацией серьезных ошибок и не влияют на научную ценность диссертационной работы, имеющей практическое и фундаментально-научное значение.

## Заключение

На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что диссертация диссертации Хайтина А.М. «Участие ионов кальция в выживании и смерти нейронов и глиальных клеток после аксотомии» является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи по выяснению процессов, приводящих к нарушениям кальциевого гомеостаза в результате аксотомии механорецепторного нейрона рака и последующей гибели нейрона и частично окружающей его глии. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 03.01.02 – Биофизика и полностью отвечает требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, а ее автор, Хайтин Андрей Михайлович, достоин присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика (биологические науки).

Официальный оппонент

доктор биологических наук

Сури́н Александр Михайлович

Главный научный сотрудник лаборатории  
фундаментальных и прикладных проблем боли  
ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Адрес: 125315 Москва, Балтийская ул., 8

Тел: +7(499)134-14-45;

e-mail: [surin\\_am@mail.ru](mailto:surin_am@mail.ru)

Подпись Сурина А.М. заверяю:

Директор ФГБНУ «НИИОПП»

Доктор мед. наук, член-корр. РАН

Морозов С.Г.



« 29 » апреля 2021 г.