

## **В І Д Г У К**

**на дисертаційну роботу Крупко Ольги Олександрівни «Роль пресинаптичних глутаматних рецепторів в модуляції процесів нейротрансмісії», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.**

### **Актуальність теми.**

Питання тонкої модуляції процесу ГАМКергічної нейротрансмісії активно досліджується, і пресинаптичні рецептори розглядаються в якості можливого засобу такої регуляції. Дія нейромедіаторів не обмежується лише локальною постсинаптичною ділянкою, вони здатні дифундувати поза межі синаптичної щілини, вивільнюватись у позасинаптичний простір за рахунок гліального екзоцитозу та роботи транспортерів у зворотньому режимі. Експресія рецепторів нейромедіаторів на різних ділянках нейронів і глії дозволяє ефективно впливати на активність нейрональної мережі. Висока варіабельність такої регуляції забезпечується локалізацією рецепторів на різних ділянках плазматичної мембрани нейрона, їх субодиничною композицією і метаботропною / іонотропною функцією. Серед позасинаптичних рецепторів особлива роль відводиться рецепторам, локалізованим на пресинапсі, оскільки їх активація дозволяє безпосередньо впливати на силу синаптичної відповіді. Провідна роль пресинаптичних рецепторів в реалізації синаптичної пластичності – центрального механізму нейрональної адаптації – обумовлює актуальність дослідження опосередкованої активацією рецепторів модуляції вивільнення нейромедіаторів у нормі та за патології.

Оригінальність обраного в дисертаційній роботі дослідницького підходу полягає у вивченні ефектів активації пресинаптичних глутаматних рецепторів, локалізованих на нервових терміналях гіпокампа і кори головного мозку щурів, на вивільнення ГАМК та перебіг секреторного процесу синаптичних везикул.

Дисертаційна робота відповідає пріоритетному напрямку розвитку науки в галузі біохімії людини та тварин і виконувалась згідно плану науково-дослідних робіт відділу нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Дисертант особисто проводила всі експериментальні дослідження, обробку результатів, підбір та опрацювання літератури. Аналіз та інтерпретація результатів досліджень проводились спільно з науковим керівником.

### **Обґрунтованість наукових положень дисертації, їх достовірність та новизна.**

Дисертаційна робота присвячена вивченню ролі пресинаптичних глутаматних рецепторів в модуляції гальмівної нейропередачі. Дослідження

проводились в нервових терміналях кори та гіпокампу головного мозку щурів за використанням міченої ГАМК, рН-, АФК- чутливих флуоресцентних зондів, специфічних агоністів та антагоністів іонотропних глутаматних рецепторів. Значний експериментальний матеріал викладено в трьох розділах власних досліджень, у яких послідовно обґрунтовується основне положення роботи, а саме – індукована глутаматними рецепторами модуляція сили синаптичної відповіді полягає у підвищенні вірогідності вивільнення нейромедіатору із нервових терміналей. У виконанні даної роботи важливим був підбір адекватних методів вирішення поставлених задач.

Зокрема, вивільнення ГАМК із нервових терміналей у відповідь на аплікацію як екзогенного глутамата, природного агоніста всіх типів глутаматних рецепторів, так і специфічних агоністів глутаматних рецепторів NMDA та AMPA/каїнатного типів оцінювали за допомогою радіактивно-міченої гама-аміномасляної кислоти ( $[^3\text{H}]$ ГАМК). Обраний підхід дозволив встановити, що функціонально активні глутаматні рецептори NMDA і AMPA/каїнатного типів локалізовані на гальмівних нервових терміналях нейронів гіпокампу та кори головного мозку і залучені до тонкої регуляції нейросекреторного процесу. А саме: активація пресинаптичних глутаматних рецепторів має наслідком посилення вивільнення гальмівного нейротрансмітера ГАМК за рахунок стимуляції екзоцитозу синаптичних везикул.

Реєстрацію екзо/ендоцитозу проводили за допомогою флуоресцентного зонду акридинового оранжевого. Такий підхід дозволив з'ясувати, що активація пресинаптичних іонотропних глутаматних рецепторів спричиняє не лише стимуляцію процесу синхронного екзоцитозу, а має також пролонгований вплив на секрецію ГАМК, зумовлений розвитком асинхронного екзоцитозу. Продемонстровано, що тригером цих процесів є вхід іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{Ca}^{2+}$ , що забезпечується активацією іонних каналів, спряжених з іГлуР. Порівняння ефектів глутамату та специфічних агоністів NMDA і AMPA/каїнатних рецепторів свідчать про залучення як NMDA, так і AMPA/каїнатних рецепторів до модуляції ефективності синаптичної передачі. Вперше показано, що активація NMDA рецепторів відповідає за швидкий синхронний екзоцитоз, тоді як наступна пролонгована фаза асинхронного екзоцитозу асоційована в більшій мірі з активацією AMPA/каїнатних рецепторів.

Дослідження процесу утворення АФК було проведено із застосуванням флуоресцентного барвнику дихлородифлуоресцеїн діацетат ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ). За умов використання різних енергетичних субстратів продемонстрована можливість домінування різних шляхів утворення АФК у нервових терміналях за умов активації різних типів глутаматних рецепторів. Використання глюкози в якості енергетичного субстрату, метаболізм якої пов'язаний з відновленням NADPH, необхідного для роботи NADPH оксидази, сприяє більш високому рівню як спонтанного утворення АФК, так і

індукованого активацією NMDA рецепторів. Піруват, навпаки, сприяє кайнат-індукованій продукції АФК. Значне пригнічення процесу генерації АФК інгібітором NADPH оксидази вказує на важливість NADPH оксидази як джерела АФК при активації пресинаптичних глутаматних рецепторів.

Аналіз матеріалу проведених досліджень дозволяє зробити висновок про достатньо повне теоретичне та експериментальне обґрунтування положень, висунутих в роботі. Разом з тим до викладу експериментального матеріалу та інтерпретації отриманих результатів є наступні міркування та зауваження:

1. Препарати синапсом, що використовувалися у даній роботі, містили як ГАМК-ергічні так і глутамат-ергічні синаптичні терміналі. Чи не могла наявність глутамат-ергічних синапсом, що також експресують глутаматні рецептори (наприклад кайнатні: FEBS Lett. 2013 18;587(6):788-92), завадити правильній інтерпретації результатів експериментів?

2. Автор наводить дані вивільнення [<sup>3</sup>H]ГАМК, що безпосередньо індуковане додаванням агоністів глутаматних рецепторів. Чи не доцільніше було б (якщо мова йде саме про модуляцію вивільнення ГАМК за рахунок активації пресинаптичних рецепторів) провести порівняння вивільнення, індукованого 4-АП з та без активації глутаматних рецепторів. Така постановка дослідження є, на мою думку, більш наближеною до досліджень саме модуляції вивільнення ГАМК та краще імітує фізіологічні процеси у синаптичних гальмівних терміналях.

3. У роботі для активації рецепторів були використані концентрації глутамату до 1 мМ. В той же час глутамат активує, НМДА рецептори у концентраціях 1-10 мкМ. Більш того мілімолярний діапазон концентрацій глутамату є токсичним для нейронів. Чим було обумовлено використання таких високих концентрацій глутамату? Чому взагалі не використовувалися широкі діапазони концентрацій агоністів необхідні для побудови дозо-залежних кривих?

4. Результати флуоресцентних досліджень представлені у вигляді «типових кінетичних кривих». Чому не була проведена статистична обробка таких кривих у деяких з проведених дослідів (наприклад у дослідях, результати яких представлені у Рис. 3.20-3.23)?

5. У розділі 3.3.2. автор наводить дані щодо інгібування спонтанної генерації АФК при вилученні Ca<sup>2+</sup> з позаклітинного середовища. Чим пояснюється така сильна залежність продукції активних форм кисню (що

найбільш вірогідно має місце всередині синаптосом) від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у позаклітинному середовищі?

Наведені вище міркування та зауваження не применшують основних положень та висновків даної роботи і скоріше повинні сприяти подальшому розвитку даних досліджень.

**Науково-практична значимість роботи та конкретні шляхи використання результатів дослідження.**

З'ясування механізмів регуляції синаптичної передачі дозволить достеменно зрозуміти природу неврологічних розладів та створити біохімічне підґрунтя щодо їх подолання. Вивчення закономірностей функціонування пресинаптичних глутаматних рецепторів у зв'язку із модуляцією ГАМКергічної нейропередачі має суттєве практичне значення як теоретична база для розробки терапевтичних засобів для лікування нейропатологій, патогенез яких пов'язаний з порушенням рівноваги між процесами збудження і гальмування в ЦНС (шизофренія, епілепсія, депресія).

**Структура роботи.** Дисертаційна робота викладена на 142 (без списку літератури), сторінках машинописного тексту та проілюстрована 32 рисунками, включає традиційно необхідні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, три розділи власних досліджень, заключний розділ, висновки, список опублікованих праць за темою дисертації і список використаних джерел (всього 312 посилань). Дисертаційна робота написана грамотно, на високому науковому рівні, з залученням значної кількості оригінальних статей вітчизняних та зарубіжних авторів. Критично проаналізовані роботи провідних наукових лабораторій, які працюють по даній проблемі.

Матеріал, викладений в дисертаційній роботі, відповідає меті та задачам досліджень, за змістом дисертація має завершений характер як самостійна науково-дослідна розробка. Сукупність експериментальних досліджень і теоретичних положень роботи є суттєвим внеском у вирішення важливої наукової проблеми – встановлення ефектів активації пресинаптичних глутаматних рецепторів, локалізованих на нервових терміналях гіпокампа і кори головного мозку щурів, на вивільнення ГАМК та перебігу секретії синаптичних везикул.

Характеризуючи роботу в цілому необхідно відмітити, що дисертант добре володіє теоретичним та фактичним матеріалом. Вона вдало спланувала дослідження та підбрала адекватні сучасні методи вирішення поставлених задач, що можуть бути використані в запропонованій моделі досліджень. Зокрема, дисертантом використано мічену ГАМК, рН-, АФК- чутливі флуоресцентні зонди, специфічні агоністи та антагоністи іонотропних

глутаматних рецепторів. Кінетичний та статистичний аналіз результатів здійснювали з використанням сучасної комп'ютерної програми Microsoft Origin Pro 8.0.

Висновки, зроблені автором, є коректними і логічно узагальнюють проведені експериментальні дослідження. Достовірність висновків підтверджується даними статистичної обробки і сумнівів не викликає. Водночас хотілось би побачити в кінці обговорення схему молекулярних процесів, що мають місце у пресинаптичних терміналях, яка б узагальнювала всі результати отримані у роботі.

Результати експериментальних досліджень, отримані в процесі виконання дисертаційної роботи, повною мірою висвітлені в 15 публікаціях, з них 6 – статті у фахових виданнях, затверджених переліком рекомендованих видань. Основні результати експериментальних досліджень і теоретичні положення достатньо повно обговорені на конференціях, список включає 9 тез доповідей.

Зміст автореферату є ідентичним основним положенням дисертаційної роботи.

**Висновок.** Вважаю, що дисертаційна робота Крупко Ольги Олександрівни “Роль пресинаптичних глутаматних рецепторів в модуляції процесів нейротрансмісії ” за актуальністю проблеми, науковою новизною отриманих результатів, можливістю практичного використання здійснених розробок, коректністю та достовірністю зроблених висновків відповідає вимогам пп. 13, 14 “Порядку присудження наукових ступенів...”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 7 березня 2007 року № 423, а її автор Крупко О. О. заслуговує надання наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

**Офіційний опонент:**

**доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник,  
завідувач лабораторії молекулярної біофізики  
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України** **Білан П. В.**

**10.09.2015 р.**