**ВІДЗИВ**

**офіційного опонента**

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

Незважаючи на значну тривалість та кількість досліджень, присвячених біохімічним закономірностям процесу нейропередачі як основи функціонування нервової системи, механізми контролювання вивільнення нейромедіаторів з нервових терміналей залишаються недостатньо з'ясованими. Частково це пояснюється відкриттям широкого спектру рецепторів до нейромедіаторів, які розрізняються не лише за будовою, механізмом активації, специфічністю, але й за локалізацією. Відкриття того факту, що рецептори до нейромедіаторів можуть бути локалізовані не лише на пост-, але й на пресинаптичній мембрані, ставить питання щодо залучення таких рецепторів до регуляції синаптичної відповіді та до розвитку нейропатологій. У зв'язку з цим тема представленої дисертаційної роботи, що спрямована на з'ясування можливої ролі пресинаптичних глутаматних рецепторів у контролюванні вивільнення гальмівного нейромедіатора ГАМК із синаптичного закінчення є актуальною.

Тема дисертаційної роботи є частиною зареєстрованих фундаментальних наукових досліджень, що протягом 2007 -2015 років виконувались у відділі нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Роботу побудовано за традиційною схемою, викладено на 142 сторінках, достатньо ілюстровано, список використаних джерел налiковує 312 найменування, серед яких переважають роботи останнього десятиріччя. Літературний огляд складається з 3-х глав, присвячених загальній характеристиці механізмів передачі сигналу між нейронами, а також детальному аналізу сучасних даних щодо особливостей будови та активації глутаматних пресинаптичних рецепторів та експериментальних підходів до вивчення їх функціонування.

Зміст представленого автореферату відповідає основним положенням дисертаційної роботи. Результати роботи опубліковано у 6-х статтях та апробовано на конференціях та з'їздах.

Свідченням достатнього ступеню обгрунтованості, достовірності отриманих у дисертації результатів та зроблених висновків є сучасний методичний рівень роботи.

Експерименти виконано на безклітинній системі (ізольовані нервові терміналі), з використанням селективних агоністів та антагоністів іонотропних глутаматних рецепторів. У роботі використано методи препаративної біохімії, ізотопні (оцінка вивільнення $^{3}$Н-ГАМК з синаптосом) та флуоресцентного аналізу (застосування зондів DCFDA, акридинового оранжевого).

Результати експериментального дослідження викладено у 3-х главах, присвячених відповідно таким показникам функціонування нервових терміналей за активації пресинаптичних глутаматних рецепторів, як вивільнення міченої ГАМК, глутамат-індуковані зміни флуоресценції синаптосом, навантажених зондом акридиновим оранжевим та продукування АФК. У роботі отримано низку важливих даних, які є свідченням її новизни. Показано, що екзогенний глутамат (в межах діапазону, властивого для синаптичної щілини після індукованого потенціалом дії вивільнення глутамату), так само, як і агоністи глутаматних рецепторів, спричиняють швидке вивільнення ГАМК із синаптосом з подальшим тривалим зниженням рівня вивільненого нейромедіатора завдяки дії мембранного транспортера. У експериментах з використанням синаптосом, навантажених акридиновим оранжевим ( тут транспортер не діє, бо не розпізнає зонд і не повертає його у синаптосому) автор демонструє «екзоцитозну» природу першої швидкої $Ca^{2+}$-залежної фази відповіді на дію глутамата (вихід барвника з везикул внаслідок їх злиття з плазматичною мембраною), а також наявність повільної $Na^{2+}$ -залежної фази відповіді внаслідок несинхронізованого екзоцитозу. З використанням специфічних антагоністів глутаматних рецепторів встановлено, що через активацію AMPA/каінатних рецепторів більшою мірою контролюється пролонгована фаза відповіді на глутамат, а через активацію NMDA рецепторів – швидка фаза. З використанням зонду DCF показано, що активація пресинаптичних глутаматних рецепторів як глутаматом, так і специфічними агоністами супроводжується посиленням продукування АФК у нервових терміналях, до якого можуть бути залучені як мітохондрії, так і НАДФН-оксидаза.

Результати дисертаційної роботи мають теоретичне значення, оскільки поглиблюють уявлення про можливі механізми контролювання синаптичної нейропередачі, зокрема, регуляції секреції гальмівного нейромедіатора ГАМК. Отримані експериментальні дані мають перспективу практичного використання у разі розробки підходів до терапевтичного коригування нейророзладів, спричинених пригніченням секреції ГАМК.

До роботи виниекають певні питання та зауваження.

1. Як можна пояснити доцільність продемонстрованої у роботі регуляції синаптичної нейропередачі за механізмом, коли збуджувальний нейромедіатор за фізіологічних концентрацій забезпечує вивільнення гальмівного?

2. Згідно даних експериментів з акридиновим оранжевим глутамат-індукований пролонгований (несинхронізований) екзоцитоз за величиною і тривалістю перевищує швидкий (синхронний). Як можна пояснити цей факт?

3. У експериментах з АО зміну флуоресцентного сигналу реєстрували у суспензії навантажених зондом синаптосом, а не у середовищі їх інкубації. Чи не виключає автор, що зонд потрапляє не лише у везикули, але й у мітохондрії, і що за таких умов посилення флуоресцентного сигналу після активації глутаматних рецепторів може бути спричинене не лише виходом зонду з везикул внаслідок екзоцитозу, але й внаслідок транзієнтного падіння (внаслідок підвищення концентрації $Ca^{2+}$) мітохондріального потенціалу, складовою якого є протонний градієнт?

4. Яким чином може здійснюватись зв'язок між активацією глутаматних пресинаптичних рецепторів та посиленням активності НАДФН-оксидази? Яким може бути механізм реалізації впливу АФК на вивільнення ГАМК з нервових терміналей?

Ці зауваження не знижують наукового рівня представленої роботи. Вважаю, що за актуальністю, науковою новизною, методичним рівнем, обсягом отриманих даних, теоретичною і практичною значимістю, обґрунтованістю висновків дисертаційна робота «Роль пресинаптичних глутаматних рецепторів в модуляції процесів нейротрансмісії» відповідає вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» відповідної постанови Кабінету Міністрів України, а її автор Крупко Ольга Олександрівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія.

Офіційний опонент
доктор біологічних наук,
професор кафедри біохімії
ННЦ "Інститут біології"
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка Матишевська О.П.

Підпис проф. Матишевської засвідчую
Заст. директора ННЦ "Інститут біології"
18 вересня 2015р.