

## ВІДГУК

1 6 ТРА 2019

Вх. № 89/03-07/1/2019

на дисертаційну роботу **Пастухова Артема Олеговича**  
“ $\text{Na}^+$ -залежний транспорт глутамату та екзоцитоз в нервових терміналях головного мозку за умов гіпотермії” на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

**Актуальність вибраної теми дисертації.** Відомо, що терапевтична гіпотермія успішно застосовується в медицині, зокрема, для запобігання розвитку і поліпшення віддалених нейрологічних показників після раптової зупинки серця, при хірургічних операціях на дузі аорти, гіпоксичної/ішемічної енцефалопатії новонароджених, у випадках інсульту, травм головного та спинного мозку, тощо. Залишаються не до кінця з'ясованими стандарти параметрів терапевтичної гіпотермії та науково обґрунтованими оптимальні ефективні температури під час хірургічних операцій. Тема дисертаційної роботи Пастухова Артема Олеговича присвячена аналізу впливу низьких температур на динаміку накопичення та вивільнення нервовими терміналями головного мозку основного збуджувального нейромедіатора глутамату. Порушення транспорту глутамату лежить в основі патогенезу переважної більшості нейрологічних захворювань, а підвищення його позаклітинного рівня є одним з основних факторів розвитку нейротоксичності, зокрема ексайтотоксичності. Відповідно, представлена дисертаційна робота вирішує актуальні завданням сучасної нейрохімії та медицини.

**Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами** Дисертаційна робота виконана у відділі нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН в рамках бюджетної теми: «Екзоцитоз та активний транспорт нейромедіаторів у пресинапсі в нормі та за умов розвитку нейропатологій: регуляція, рецептор-опосередкована модуляція та пошук шляхів нейропротекції» (2014-2018 рр., № д.р. 0114U003214); та у рамках грантів: 1) Державної цільової науково-технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали» (2010–2014 рр., № д.р. 0110U005957), 2) Цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (2010–2014 рр., № д.р. 0115U003641), 3) Цільової комплексної програми НАН України з наукових космічних досліджень (2018-2022 рр., № д.р. 0118U000376).

**Мета і задачі дослідження.** Мета дисертаційної роботи сформульована чітко: дослідити модуляцію  $\text{Na}^+$ -залежного накопичення та вивільнення, а також позаклітинного рівня глутамату та екзоцитозу в нервових терміналях

головного мозку за умов помірної та глибокої гіпотермії. А конкретні завдання, поставлені в роботі, в повній мірі відповідають меті.

Робота виконана сучасними методами біохімії та фармакології.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В дисертаційній роботі Пастухова А.О. на моделі синаптосом, отриманих із головного мозку щурів, досліджені особливості процесу транспорту нейромедіатора глутамату за умов помірної та глибокої гіпотермії. Встановлено, що в умовах зниження температури зменшується тонічне вивільнення та екзоцитоз глутамату, однак не змінюється його позаклітинний рівень. Показано, що температурні режими пригнічують транспортер-опосередковане вивільнення глутамату з нервових терміналей через дисипацію протонного градієнта синаптичних везикул, негативного впливу на гомо- та гетерообмін глутамату. Встановлено, що температурно-залежна динаміка вивільнення глутамату з нервових терміналей в переважній більшості залежить від активації пресинаптичних NMDA іонотропних глутаматних рецепторів.

**Практичне значення роботи.** В роботі отримані експериментальні дані щодо комбінованого синергічного застосування фармакологічного виснаження холестеролу із мембран за дії метил- $\beta$ -циклодекстрину та гіпотермії на вивільнення глутамату нервовими терміналами, яке призводить до майже повного пригнічення патологічного транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату. Результати щодо комбінованого впливу гіпотермії та протисудомного препарату леветирацетаму є перспективним комплексним підходом для збільшення позитивних ефектів гіпотермії і подовження часу її застосування, що є доцільним для використання у медицині та фармакології.

Отримані дані можуть бути використані при розробці методичних рекомендацій із застосування гіпотермії для попередження та зменшення наслідків гіпоксичних/ішемічних уражень нервової системи.

**Структура та обсяг дисертації.** Ця дисертаційна робота викладена на 163 сторінках друкованого тексту і складається із вступу, огляду літератури, експериментальної частини, яка включає опис матеріалів і методів, отримані результати, аналіз і узагальнення результатів досліджень, висновки та список використаних літературних джерел, що охоплює 302 найменувань. Робота містить 37 рисунків.

В літературному огляді досить ретельно проаналізовано сучасні відомості щодо рецепторно-транспортної системи глутамату в ЦНС, також наведені дані щодо взаємозв'язку між рівнем холестеролу та нейтротрансмісією, та стану проблеми з терапевтичною гіпотермією та терапевтичними підходами для підсилення/корекції її ефектів. Автором самостійно зроблені схематичні

ілюстрації для покращення розуміння описаних механізмів, що значно покращує сприйняття наведених літературних даних і свідчить про здатність автора до узагальнення та виокремлення головного. Пастухов А.О. проаналізував 302 джерела, виключно англійською мовою, які мають безпосереднє відношення до теми дисертації і віддзеркалюють сучасний стан проблеми. В кінці огляду літератури наведений абзац узагальнення щодо актуальності та необхідності проведення дисертаційних досліджень.

Результати досліджень викладені логічно, добре систематизовані, опрацьовані статистично. Вражає кількість проведених досліджень, склалось враження, що автор намагався відповісти на всі можливі запитання.

Варто відмітити, що в дисертаційній роботі Пастухова А.О. наведені не лише фактичні дані щодо вимірювання вивільнення та накопичення глутамату за різних температурних режимів (37, 27, 17°C), а і проведені експериментальні дослідження застосування комбінованого підходу для зменшення вивільнення глутамату, зокрема із застосуванням гіпотермії на фоні дії протисудомного препарату леветирацетаму, який не має чіткого механізму дії і скоріше за все впливає на декілька мішеней, та метил- $\beta$ -циклодекстрину (M $\beta$ CD), який опосередковує свій механізм через вивільнення холестеролу із плазматичних мембран. Також показано, що синапсами мають різну активність щодо інтенсивності транспорту глутамату за умов гіпотермії, що є теоретичним підґрунтям для подальшого з'ясування ролі різних ділянок мозку в нейропротекторній дії гіпотермії.

У розділі «Обговорення результатів» зроблений детальний аналіз отриманих результатів, а також проведено їх співставлення з літературними даними для обґрунтування застосування температурних режимів з огляду на механізми транспорту глутамату в нервових терміналях.

У висновках чітко повністю відображені основні результати його дисертаційної роботи.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.** За результатами дисертації опубліковано 12 робіт, з них 7 статей у вітчизняних та іноземних фахових наукових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, причому 6 із них реферуються БД Scopus/Web of Science і 5 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових форумів.

Дисертаційна робота Олега Валерійовича заслуговує на позитивну оцінку, але в процесі роботи над дисертацією виникли деякі зауваження та дискусійні питання та побажання:

Зокрема:

1. Огляд літератури хотілося б більше структурувати, адже всі пункти розрізнені, і це не справляє загального враження про червону лінію думок автора, який повинен логічно підвести читача до мети своєї роботи.

Наприклад: автори наводять літературні дані щодо різних механізмів транспорту глутамату: цьому присвячено підрозділи 1.2.-1.6 - було б інформативніше об'єднати ці підрозділи під єдиною назвою «Механізми транспортування глутамату». Потім поділити їх на натрій-залежні та натрій-незалежні. Адже не зрозуміло, що в підрозділі під назвою «Синапс» - буде йтися про механізми везикулярного транспорту глутамату. Теж саме стосується відомостей щодо терапевтичної гіпотермії і терапію інсульту, якій присвячені підрозділи 1.9-1.11.

2. Розділ матеріали і методи виграв би, якщо містив би окремий підрозділ зі схемою експерименту, де були приведені деталі всіх протоколів, а також характеристику застосованих фармпрепаратів, адже про деякі фармакологічні модулятори і застосовані концентрації, наприклад конкурентний нетранспортабельний інгібітор DL-TBOA, протонатор FCCP, леветирацетаму, селективний антагоніст бензодіазепінових рецепторів (GABA<sub>A</sub> рецепторів) -флумазеніл. читач дізнається тільки після детального вивчення Розділу власних результатів досліджень. Також не зрозуміли є вибор точок 6 хв і 14 хв щодо оцінки характеру нестимульованого вивільнення глутамату.
3. Підрозділ 3.1. Експериментальні підходи для аналізу ключових характеристик нейропередачі за умов норми та гіпоксії, описує додаткові умови проведеного експерименту і більш логічно, мав би бути наведений в розділі 2 Матеріали та методи.
4. Крім того в роботі наводяться дані про «розробку та верифікацію глутаматного біосенсору», який має такий же ступінь чутливості як і радіактивно мічений глутамат, при цьому не зрозуміло, як його застосовували для проведення досліджень?
5. П.п. 3.2. «Вивільнення глутамату з нервових терміналей за умов нейропатологій» не містить даних про нейропатології, а описує результати моделювання транспортної функції глутамату і її залежності від температури. Тому коректніше було б виключити із назви нейропатології. Назвати, наприклад «Стимульоване вивільнення глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії».

6. В результатах досліджень, пп 3.1.4. не наведено ілюстративного матеріалу чи фактичних даних щодо ефекту блокади транспортера конкурентним нетранспортабельним інгібітором DL-TBOA на рівень накопичення позаклітинного глутамату, що ускладнює сприйняття, а також аналіз вірогідності отриманих даних.
7. Також в роботі є невдалі вирази - «родина мітохондрійних транспортерів SLC25» - родина транспортерів мітохондрій; калька з англійської мови - «нокаутні миші», «таргетінг мембрани», які не впливають на загальний зміст роботи.

**В якості дискусії хотілося почути відповіді на наступні запитання:**

1. В частині дослідів рівень позаклітинного L-[<sup>14</sup>C]глутамату знижувався за умов гіпотермії (рис. 3.5., А), в частині – збільшувався (рис. 3.5., Б). Причому зниження мало вірогідний характер. Який відсоток синапсом мав той чи інший патерн? Як це може співвідноситися з протилежними даними літератури щодо позитивного чи негативного впливу глутамату при гіпотермії?

Аналогічний патерн спостерігався при застосування леветирацетаму, що додатково підтверджує значимість цієї різниці і необхідність розглядати ці групи синапсом окремо.

2. При нестимульованому вивільненні глутамату, Ви спостерігали більш виражений ефект щодо зменшення його вивільнення, при T=27C, проте незалежно від типу стимулятора KCI чи протоніфор, ви спостерігали позитивний температуро-залежний ефект. Чим можна пояснити таку різницю?

3. В роботі дані представлені як % від загального вмісту глутамату. При цьому цей показник варіює від 4% (при 37C, тонічне вивільнення глутамату) до 35% при стимулюванні глутаматом (гомообмін). Відповідно зміни ефекту на фоні гіпотермії також мають різну глибину. Чи аналізували Ви цей показник і чи враховували Ви його при визначенні найбільш значимого механізму вивільнення глутамату за гіпотермії?

4. Трохи не зрозумілою є різниця у показниках вивільнення глутамату за дії MCD, зокрема рівень позаклітинного L-[<sup>14</sup>C]глутамату значно підвищується після обробки MCD в контролі та за умов гіпотермії. Проте рівень позаклітинного L-[<sup>14</sup>C]глутамату був значно зниженим за умов стимулювання транспортер-опосередкованого шляху та екзоцитозу після обробки MCD. Як це можна пояснити, якщо MCD не специфічно знижує рівень холестеролу?

Вищенаведені питання і побажання не знижують наукової цінності дисертаційної роботи, адже вони стосуються переважно її оформлення та інтерпретації результатів.

**Загальний висновок.** Зважаючи на актуальність теми, наукову новизну одержаних результатів, теоретичне і практичне їх значення, високий методичний рівень проведених досліджень та інші позитивні якості дисертаційної роботи Пастухова Артема Олеговича, вважаю, що вона відповідає вимогам п.п. 11, 12, 13 “Порядку присудження наукових ступенів”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р., № 567 (зі змінами), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Начальник науково-дослідної частини,  
професор Інституту високих технологій  
Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка, д.б.н., проф.



Толстанова Г.М.

