

Голові разової спеціалізованої ради

ID 16993

Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця

НАН України

доктору медичних наук, професору,

члену-кореспонденту НАН України

завідувачу відділу цитології

Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця

НАН України

Скибо Галині Григорівні

РЕЦЕНЗІЯ

доктора медичних наук, провідного наукового співробітника

відділу цитології

Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

Цупикова Олега Михайловича

на дисертаційну роботу

Науменко Яни Олегівни

«Розподіл глутаматного транспортера GLT-1 у гіпокампі мишей після
легкої черепно-мозкової травми та його корекція цефтріаксоном»

виконану на здобуття ступеня доктора філософії

з галузі знань 09 Біологія

за спеціальністю 091 Біологія

Актуальність теми дисертаційної роботи

Дисертаційна робота Науменко Я. О. присвячена актуальній проблемі сучасної нейробіології – дослідженню змін глутаматного гомеостазу після легкої черепно-мозкової травми (лЧМТ). Особливий інтерес становить вивчення глутаматного транспортера GLT-1 (EAAT2), який відіграє ключову роль у видаленні надлишкового глутамату з позаклітинного простору та

запобіганні ексайтотоксичному ушкодженню нейронів. Актуальність цього напряму зумовлена тим, що при лЧМТ, попри відсутність виражених структурних змін, можуть тривало зберігатися молекулярні та клітинні порушення, які визначають подальші функціональні наслідки травми. У цьому контексті дослідження не лише загального рівня GLT-1, а й особливостей його просторового розподілу є важливим для поглиблення уявлень про механізми посттравматичної ексайтотоксичності.

Важливим аспектом роботи є також оцінка впливу цефтріаксону на виявлені зміни. Авторкою обґрунтовано вибір СА1 зони гіпокампа як об'єкта дослідження, оскільки ця структура є чутливою до ексайтотоксичного ушкодження та має важливе значення для когнітивних функцій. Отже, тема дисертації є актуальною як у фундаментальному, так і в потенційному прикладному аспектах.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретична та практична значущість

Наукова новизна роботи полягає насамперед у систематичному дослідженні просторового розподілу GLT-1 в астроцитах та пірамідних нейронах СА1 зони гіпокампа мишей після лЧМТ. Авторкою вперше показано, що після травми відбувається зміна просторової організації GLT-1 із формуванням більш виражених кластерів у клітинах обох типів. Встановлено також часову динаміку цих змін на 3-ю, 7-у та 14-у доби після травми та продемонстровано вплив цефтріаксону на характер розподілу транспортера. Окремої уваги заслуговує виявлення GLT-1 у соматичному відділі пірамідних нейронів СА1 за умов лЧМТ, що розширює сучасні уявлення про клітинну локалізацію цього транспортера.

Теоретичне значення роботи визначається розширенням уявлень про механізми порушення глутаматного гомеостазу після лЧМТ. Отримані результати підкреслюють важливість оцінювання не лише кількісного рівня GLT-1, а й його просторової організації. На основі результатів запропоновано концептуальну модель, яка пов'язує кластеризацію GLT-1 із

посттравматичною ексайтотоксичністю та розглядає вплив цефтріаксону на цей процес.

Практичне значення отриманих результатів полягає у формуванні підґрунтя для подальших доклінічних досліджень фармакологічної корекції порушень глутаматного транспорту після ЧМТ. Водночас авторка коректно зазначає, що виявлені морфологічні зміни потребують подальшої функціональної верифікації.

Обґрунтованість та достовірність наукових положень й висновків

Обґрунтованість основних положень дисертації забезпечується логічно побудованим дизайном дослідження, використанням адекватної експериментальної моделі лЧМТ та комплексу сучасних морфологічних і кількісних методів. У роботі застосовано імуногістохімічне флуоресцентне маркування NeuN, GFAP та GLT-1, конфокальну лазерну скануючу мікроскопію, а також напівавтоматичний аналіз флуоресцентних зображень із використанням програмного забезпечення на базі Napari/Python. Статистичний аналіз проведено із застосуванням непараметричних методів, що відповідають характеру отриманих даних.

Експериментальний дизайн містив контрольні та групи із травмою, а також групи з введенням цефтріаксону, що дозволило оцінити як вплив самої травми, так і фармакологічну корекцію в різні часові проміжки. Важливо, що авторка окремо розглянула методологічні обмеження дослідження, зокрема відсутність прямих функціональних вимірювань активності GLT-1, обмеження конфокальної мікроскопії щодо визначення молекулярної кластеризації, невеликий розмір експериментальних груп та використання лише самців. Це свідчить про належний рівень критичного осмислення власних результатів.

Отримані результати узгоджуються з поставленою метою та завданнями, а сформульовані висновки логічно впливають із представлених експериментальних даних. Достовірність отриманих результатів підтверджується наявністю статистично значущих відмінностей між

відповідними експериментальними групами та їх послідовним обговоренням у контексті сучасних літературних даних

Основні результати опубліковано у двох статтях у провідних міжнародних виданнях (Heliyon, Q1; Biochem Biophys Res Commun, Q2), що підтверджує високий рівень експертної оцінки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних робіт Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: гранту НАН України (реєстраційний номер 0124U001556).

У межах зазначеної теми авторкою досліджено особливості розподілу GLT-1-імунореактивності в зоні CA1 гіпокампа мишей після легкої черепно-мозкової травми та за умов введення цефтріаксону. За своєю спрямованістю робота стосується вивчення нейрогліальних взаємодій і змін структурної організації компонентів глутаматного гомеостазу при експериментальному ушкодженні головного мозку.

Структура, обсяг та повнота викладення матеріалів дисертаційної роботи

Дисертаційна робота викладена на 160 сторінках, із яких 135 становить основний текст. До її структури входять вступ, чотири розділи, висновки та список використаних джерел, що налічує 136 найменувань. Робота містить 5 рисунків і 4 таблиці.

Зауваження та запитання до дисертаційної роботи

Оцінюючи дисертаційну роботу, варто вказати на деякі дискусійні моменти та зробити такі зауваження:

- 1) У роботі термін «кластеризація GLT-1» використовується для опису субмікронних угруповань флуоресцентного сигналу. Водночас авторка слушно зазначає, що роздільна здатність конфокальної мікроскопії не дає змоги безпосередньо підтвердити молекулярну кластеризацію. Було б доцільно чіткіше розмежувати поняття «кластеризація

флуоресцентного сигналу» та «молекулярна кластеризація» в окремих формулюваннях тексту.

- 2) Дослідження носить гістологічний характер і базується на методах імунофлуоресценції, що не дозволяє прямо оцінити функціональну здатність (ефективність захоплення глутамату) виявлених кластерів GLT-1. У роботі запропоновано механістичну модель, відповідно до якої кластеризація GLT-1 може знижувати ефективність глутаматного кліренсу, а цефтріаксон сприяє відновленню просторового розподілу транспортера. Оскільки безпосередніх функціональних вимірювань транспорту глутамату не проводилося, доцільно було б у висновках більш чітко акцентувати на концептуальному, а не остаточно доведеному характері запропонованого механізму.

У зв'язку з цим до авторки виникли такі запитання:

- 1) У вашій роботі зазначено, що застосоване антитіло анти-GLT-1 (OSE00004W, ThermoFisher Scientific) не розрізняє мембранну та внутрішньоклітинну фракції GLT-1. Як це обмеження може впливати на інтерпретацію «кластеризації» – чи допускаєте Ви, що частина цих кластерів є виключно внутрішньоклітинними пулами неактивного білка, які готуються до лізосомальної деградації?
- 2) Ви виявили відтермінований ефект цефтріаксону на нейрональну GLT-1 на 14-у добу, незважаючи на те, що введення препарату було завершено ще на 5-й день. Які саме молекулярні механізми, на Вашу думку, здатні підтримувати такий довготривалий ефект?
- 3) Чи планується у Ваших подальших дослідженнях оцінка перерозподілу GLT-1 в інших регіонах мозку (наприклад, у корі або зубчастій звивині гіпокампа), які також піддаються інтенсивному впливу глутаматної ексайтотоксичності під час лЧМТ?

Зауваження та запитання мають переважно дискусійний характер і не знижують загальної позитивної оцінки роботи.

Загальний висновок офіційного рецензента

Дисертаційна робота Науменко Я. О. є завершеним, самостійним науковим дослідженням, у якому вирішено важливе наукове завдання щодо з'ясування просторового розподілу глутаматного транспортера GLT-1 після легкої черепно-мозкової травми та його корекції. Дисертаційна робота повністю відповідає вимогам "Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44, вимогам до опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук, затверджених наказом МОН України від 23 вересня 2019 р. № 1220, вимогам щодо оформлення дисертації, затвердженими наказом МОН України від 12 січня 2017 р. № 40 (зі змінами, внесеними наказом МОН України від 31 травня 2019 р. №759) та відповідає напряму наукових досліджень освітньо-наукової програми Біологія (Біофізика; Фізіологія людини і тварин; Патологічна фізіологія) третього освітньо-наукового рівня вищої освіти Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України зі спеціальності 091 Біологія.

Рецензент

доктор медичних наук,
провідний науковий співробітник
відділу цитології
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України

 Олег ЦУПИКОВ

