

**ОТЗЫВ официального оппонента  
на диссертацию на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук Тимошиной Юлии Анатольевны  
на тему:  
«РОЛЬ Na,K-АТФазы В ПОВЕДЕНЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ У  
МЫШЕЙ, ИНДУЦИРОВАННЫХ УАБАИНОМ, МАРГАНЦЕМ И  
МФТП»  
по специальности 1.5.24. Нейробиология**

Na,K-АТФаза обеспечивает градиент натрия и калия на плазматической мембране клеток животных, и ее функционирование необходимо для жизнеспособности всех клеток организма. В нейрональных клетках ее нормальное функционирование особенно важно, и на работу Na,K-АТФазы тратится до 80% АТФ. Благодаря работе этого фермента реализуются в том числе электрогенные свойства нейронов. Кроме того, Na,K-АТФаза также является рецептором к кардионическим стероидам (КТС), в частности, уабаину, опосредуя целый ряд сигнальных каскадов, вовлеченных в регуляцию пролиферации и гибели клеток. Функциональный мономер фермента состоит из каталитической альфа субъединицы и бета субъединицы. В ткани мозга экспрессируются три изоформы альфа субъединицы: повсеместно распространенная альфа1 субъединица, альфа2 субъединица в глиальных клетках и альфа3 субъединица в нейронах, которые несколько отличаются своим сродством к ионам. Разнообразие сигнальных каскадов, которые индуцирует связывание Na,K-АТФазы с КТС обусловлено тем, что Na,K-АТФаза взаимодействует с целым рядом белков, а также тем, что связывание различных КТС вызывает различные конформационные изменения фермента и, соответственно, различные ответы. Кроме того, в настоящее время стало ясно, что индуцировать сигнальные каскады может не только альфа1 субъединица Na,K-АТФазы, но и остальные изоформы. Также крайне актуальным является вопрос о роли эндогенных КТС в регуляции функции мозга и их влиянии на поведение.

Роль тканеспецифичной альфа<sub>3</sub> изоформы в неврологических заболеваниях в настоящее время очень интенсивно исследуется. Известно, что мутации в альфа<sub>3</sub> субъединице приводят к тяжелым неврологическим расстройствам, в частности, вызывая быстроразвивающуюся дистонию-паркинсонизм (БРДП) и альтернирующую гемиплегию детства (АГД). У животных мутации альфа<sub>3</sub> или ингибирование фермента приводят к развитию мания-подобного поведения. Активно исследуется роль ингибирования Na,K-АТФазы также в снижении функционирования нейронов при болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона. При болезни Паркинсона описано образование внутриклеточных кластеров а-синуклеина с а<sub>3</sub>-субъединицей, которое приводит к снижению активности фермента. Для моделирования индуцированного паркинсонизма используют МФТП. Повышенные уровни марганца вызывают окислительный стресс и, кроме того, марганец индуцирует эпигенетические модификации гена альфа<sub>3</sub> субъединицы Na,K-АТФазы. Неврологические симптомы при манганизме (повышенном уровне марганца) схожи с симптомами, развивающимися у людей с гаплонедостаточностью по гену, кодирующему альфа<sub>3</sub> субъединицу Na,K-АТФазы. Однако роль Na,K-АТФазы в изменении когнитивной функции и поведения животных при данных патологических воздействиях – повышенном уровне КТС, повышенном уровне марганца и МФТП индуцированного паркинсонизма не ясна. В связи с этим тема диссертационного исследования представляется очень актуальной как с теоретической, так и с практической точки зрения.

Диссертационная работа написана по стандартному плану и содержит 172 страницы машинописного текста, 41 рисунок и 1 таблицу. Она состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение». В конце работы дано «Заключение», где обсуждается возможное физиологическое значение полученных экспериментальных данных, приведены «Выводы» и «Список сокращений». Приведенный в конце работы «Список литературы» включает 281 источник.

Во «Введении» дана вся необходимая информация о работе и приведены цель и задачи исследования. Обзор литературы состоит из четырех основных разделов. В первом разделе рассматривается общая характеристика Na,K-АТРазы, включая строение фермента и механизм его функционирования, описание специфических лигандов Na,K-АТФазы кардиотонических стероидов, способы регуляции Na,K-АТФазы, а также роль Na,K-АТФазы в неврологических заболеваниях и генетические модели животных с мутациями в гене альфа3 изоформы (ATP1A3). Во втором разделе обзора рассмотрены литературные данные о марганце, как модуляторе работы Na,K-АТФазы в центральной нервной системе, в том числе описаны функции марганца в норме, причины его нейротоксичности, способы проникновения и вывода марганца из центральной нервной системы и влияние марганца на Na,K-АТФазу. В третьем разделе обзора описана этиология и патогенез болезни Паркинсона, а четвертый содержит описание участия Na,K-АТФазы в патогенезе данного заболевания. Обзор изложен логично и написан хорошим языком, в нем приведено много важной информации, необходимой для понимания проведенной работы и полученных автором результатов. Автор очень вдумчиво и подробно описывает роль Na,K-АТФазы в неврологических заболеваниях. Обзор литературы хорошо подготавливает читателя к пониманию результатов и никаких существенных замечаний к обзору нет. Есть несколько мелких замечаний, среди которых следующие. Автор упоминает о том, что фосфорилирование протеинкиназой С увеличивает активность фермента, однако оно может также приводить к уходу Na,K-АТФазы из мембранны, в частности, при гипоксии, что будет вызывать снижение активности. Также в связи с используемой мышью моделью в литературном обзоре можно было бы написать о свойствах резистентности к кардиотоническим стероидам альфа1 субъединицы грызунов.

В разделе Материалы и Методы подробно описаны все использованные в работе методы. Раздел очень хорошо структурирован. Очень тщательно и

подробно описаны все экспериментальные процедуры, ход работ и методики. Приведенное описание достаточно для воспроизведения всех приведенных результатов. Данный раздел явно свидетельствует об большом объеме работы, который пришлось выполнить Юлии Анатольевне для получения представленных результатов. Автор освоил широкий набор методов, которые включают методы работы с клеточными культурами, различные биохимические и аналитические методы (Вестерн-блот анализ, определение активности Na,K-АТФазы, иммуногистохимия, масс-спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография), а также методы работы с животными, начиная с введения препаратов в центральную нервную систему и заканчивая разнообразными поведенческими тестами. Все приведенные методы были эффективно использованы в работе.

В разделе Результаты и обсуждение приведены основные экспериментальные данные, полученные диссертантом, и дана их интерпретация. В начале каждого раздела приведена схема эксперимента, что сильно облегчает понимание приведенных результатов. Основными результатами работы являются следующие. Сравнение действия специфического лиганда и ингибитора Na,K-АТФазы уабаина на недифференцированные и дифференцированные по дофаминергическому типу клетки линии нейробластомы человека SH SY5Y продемонстрировало, что в обоих случаях происходит снижение дофамина в культуральной среде, и этот эффект не связан с цитотоксическим действием уабаина. Для дифференцированных клеток также показано, что уабайн усиливает метаболизм дофамина. В случае недифференцированных клеток уабайн проявлял большую цитотоксичность, чем для дифференцированных. Цитотокическое действие уабаина предотвращалось ингибитором протеинкиназы С. Для недифференцированных клеток было показано также, что в цитотокическое действие уабаина вовлечена активация ERK1/2 и снижение содержания антиапоптотического белка Bcl 2. Автор также показал, что ингибирование дофаминовых D2-рецепторов, AMPA и

каинатных глутаматных рецепторов не влияет на реализацию токсического эффекта уабаина. На мышевой модели было выявлено, что многократное внутрижелудочковое введение уабаина вызывает повышение двигательной активности мышей, что свидетельствует о развитии мания-подобного состояния. Также отмечалось нарушение координации движений, сопровождающееся снижением активности Akt киназы. Автор полагает, что это следствие активации уабаином D2-рецепторов. Также многократное введение уабаина приводит к снижению NR2B-субъединицы NMDA-рецептора в стриатуме мышей, тогда как уровень альфа1 и альфа3 изоформ Na,K-АТФазы не изменялся. Длительное потребление марганца вызывает снижение двигательной активности животных, а также нарушение координации движений. Начало этих нарушений сопровождается снижением активности Na,K-АТФазы, увеличением экспрессии всех изоформ Na,K-АТФазы в мозжечке и увеличением активности киназы ERK1/2 в стриатуме. Показано, что в модели предсимптоматической стадии МФТП индуцированного паркинсонизма изменения активности Na,K-АТФазы в среднем мозге и мозжечке не происходит. Тщательность описания методов и результатов, а также проведенный в работе статистический анализ данных, позволяет с уверенностью заключить, что достоверность представленных данных не вызывает сомнений.

Представленные данные предоставляют уникальную возможность оценить вклад Na,K-АТФазы в целом и ее изоформ в изменение когнитивной функции и поведения животных при таких патологических воздействиях, как повышенный уровень КТС, повышенный уровень потребления марганца и МФТП индуцированный паркинсонизм. Кроме того, исследование действия КТС на недифференцированные и дифференцированные по дофаминergicкому типу клетки нейробластомы человека, которое продемонстрировало влияние уабаина на выход в среду дофамина и интенсивность его метabolизма, прекрасно дополняет исследование на животных. Все полученные данные являются новыми, и сделанные в работе

выводы полностью обоснованы. Проведенное исследование открывает новые перспективы для экспериментальных работ по изучению роли изоформ Na,K-АТФазы и ее специфических лигандов эндогенных и экзогенных кардиотонических стероидов в регуляции поведенческих нарушений. В связи с этим необходимо отметить, что данная диссертационная работа представляет ценность как с фундаментальной, так и с практической точки зрения и ее продолжение очень перспективно. Однако, к разделу Результаты и обсуждение есть ряд замечаний.

Очень интересен обнаруженный эффект снижения уровня дофамина в среде культивации недифференцированных и дифференцированных клетках нейробластомы человека SH-SY5Y. Из представленных данных видно, что снижение не связано с цитотоксическим действием уабаина. Можно ли предположить какой-то механизм для обнаруженного эффекта снижения дофамина?

Возникает вопрос почему ингибитор пути MEK/ERK PD0325901 снижает токсичность действия уабаина на недифференцированные клетки при концентрации 10 нМ уабаина, но не оказывает такого влияния при 100 нМ уабаина? Интересно также понять, предполагаемую причину различного действия уабаина на недифференцированные и дифференцированные клетки нейробластомы? Можно ли предположить, что одной из причин этих эффектов является изменение экспрессии разных изоформ Na,K-АТФазы при дифференцировке? Возможно, в будущем имеет смысл посмотреть реализацию апоптоза, дисфункцию митохондрий и возрастание АФК, а также активацию партнера Na,K-АТФазы Src-киназы для лучшего понимания механизма токсичности.

В обсуждении результатов действия уабаина на мышах необходимо учитывать, что вследствие того, что в отличие от человека  $\alpha 1$  изоформа у мышей является резистентной к действию уабаина, используемые дозы уабаина будут существенно менее токсичными, чем для человеческих клеток и, вероятно, не должны вызывать значительного снижения общей активности

Na,K-АТФазы. Ингибируясь в первую очередь будут тканеспецифичные изоформы  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ , возможно, убаин-резистентная  $\alpha 1$  ответственна за наблюдалемую активацию.

Интересным фактом также является то, что изменение активности Na,K-АТФазы после введения уабаина в разных структурах мозга различно и быстро меняется во времени. Автор полагает, что активирующие действие введенного в мозг уабаина связано с низкой его концентрацией, в то время как последующее ингибирующее действие вызвано возрастанием концентрации в данной структуре мозга. Безусловно, как отмечает и сам автор, для понимания результатов введения уабаина в мозг мыши было бы полезно в будущем постараться оценить уровень введенного уабаина в разных структурах мозга.

В работе показано, что при хроническом потреблении марганца через две недели наблюдается снижение активности Na,K-АТФазы в мозжечке, сопровождающееся, возможно, компенсаторным возрастанием уровня экспрессии альфа1, альфа2, альфа3 изоформ Na,K-АТФазы. В это время еще не отмечается накопления марганца в ткани и не регистрируется изменения Na/K в ткани мозга. Однако при больших временах потребления марганца (3 и более недель) активность Na,K-АТФазы и экспрессия изоформ возвращаются практически к контрольным значениям. Как Вы считаете, с чем это может быть связано?

Кроме этого, есть технические замечания. В тексте встречается ряд опечаток, в том числе вместо количества вещества, выраженного в молях иногда употребляется обозначение М (моль/л), в методах оценки Na,K-АТФазной активности стоит указать общий объем пробы, при упоминании альфа и бета в начале предложения их следует писать словом.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации

соответствует специальности 1.5.24. Нейробиология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Тимошина Юлия Анатольевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.24. Нейробиология.

Официальный оппонент:

кандидат физико-математических наук,  
ведущий научный сотрудник лаборатории  
конформационного полиморфизма белков в норме и патологии  
«Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института  
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук»

Петрушанко Ирина Юрьевна

*подпись*

*05.12.25.* Дата подписания

Контактные данные:

тел.: , e-mail: Специальность, по которой  
официальным оппонентом защищена диссертация:  
03.00.02 – Биофизика

Адрес места работы:

ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32, ИМБ РАН.  
Тел.:

Подпись сотрудника ИМБ РАН  
И.Ю. Петрушанко удостоверяю

Ученый секретарь  
*«05» декабря 2015 г.*

Коновалова Е.В.