

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

д.б.н., профессора, главного научного сотрудника, и.о. заведующего лабораторией физической химии биополимеров Федерального Исследовательского Центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук Ванина Анатолия Фёдоровича на диссертационную работу Родькина Станислава Владимировича «Роль монооксида азота и белков клеточной смерти в нервной ткани при повреждении нерва и фотоокислительном воздействии у животных», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия

Актуальность темы исследования.

Большой экономический ущерб сельскому хозяйству страны приносят онкологические заболевания, которые являются одной из важных причин инвалидности и смертности животных. Известно, что при таком перспективном методе лечения данных заболеваний, как ФДТ, который все шире внедряется в лечебную практику, поражаются не только опухолевые, но и здоровые клетки, вследствие развития мощного фотоокислительного стресса. На сегодняшний день известно, что монооксид азота (NO) участвует в процессах выживания и гибели опухолевых клеток при фотодинамическом воздействии. Однако его роль в здоровых клетках нервной системы при фотоокислительном стрессе остается недостаточно изученной. Особый интерес вызывают сигнальные механизмы генерации NO в фотосенсибилизированных нейронах и глиальных клетках при облучении. Так хорошо известно, что Ca^{2+} активирует нейрональную, а также эндотелиальную изоформы NO-синтаз. Вместе с тем, остается открытым вопрос о вкладе внеклеточного Ca^{2+} и значимости Ca^{2+} -тока через различные Ca^{2+} -каналы, а также Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума в генерации NO в нейронах и глиальных клетках при фотоокислительном стрессе.

Другим немаловажным аспектом является роль ядерного фактора-карраВ (NF-κB) в регулировании фотоиндуцированной продукции NO в клетках нервной ткани. Известно, что NF-κB - фактор транскрипции

индуцибельной NOS (iNOS). Однако NF-κB-сигнальные механизмы генерации NO, а также значение iNOS в нейронах и глиальных клетках в условиях фотоокислительного стресса остаются практически не изученными.

Следует отметить также механизмы обратной связи между NOS и гуанилатциклазой (sGC), которая является молекулярной мишенью для NO. В свою очередь sGC может выступать в качестве NO-регулятора через активацию различных сигнальных путей, модулирующих внутриклеточный уровень монооксида азота. Однако тонкие молекулярные механизмы связи между sGC и NO при фотодинамическом воздействии остаются открытыми.

Другой серьезной проблемой в области ветеринарии являются травмы различных отделов периферической нервной системы, в частности, повреждения периферических нервов вплоть до их полного разрыва (аксотомия). Такие повреждения сопровождаются каскадом различных изменений на молекулярном и клеточном уровне, которые приводят к гибели нейронов и глиальных клеток. Ряд исследований показали, что NO принимают активное участие в этом процессе, наряду с такими проапоптотическими белками, как p53, E2F1 и APP. Стоит отметить, что всё больше литературных научных данных указывают на тонкие механизмы NO-зависимого регулирования данных белков, особенно p53, известного как опухолевый супрессор и «страж генома», контролирующего экспрессию множества генов, по некоторым данным более 3000. Регулирование экспрессии p53 через NO-зависимые сигнальные пути исследовалось на различных экспериментальных моделях с помощью доноров NO и ингибиторов NOS. Однако механизмы NO-зависимого регулирования p53 в периферической нервной системе при аксотомии практически не изучены.

Немаловажным является изучение E2F1, одного из ключевых белков, играющего важную роль в регуляции клеточного цикла, репарации и репликации ДНК, а также в апоптозе. Известно, что этот белок является фактором транскрипции p53, а также участвует в подавлении экспрессии Mdm2. Кроме этого NO может регулировать уровень E2F1 через

гиперфосфорилирование и инактивацию pRb, что приводит к увеличению экспрессии E2F1. Однако механизмы экспрессии и локализации данного белка в условиях аксонального стресса остаются слабо изученными.

Особого внимания заслуживает белок предшественник бета-амилоида (APP), которого чаще всего рассматривают в контексте патогенеза болезни Альцгеймера, хотя его роль в организме гораздо шире. Известно, что APP накапливается в поврежденных нейронах при ишемическом либо травматическом воздействиях, однако его роль при аксотомии освещена в научных источниках довольно слабо и носит противоречивый характер. Также известно, что NO может модулировать амилоидогенный путь процессинга APP, а p53 контролировать уровень APP по средствам репрессирования промотора его гена. Несомненно, изучение механизмов его экспрессии и локализации при травме нерва может помочь в понимании сложного APP-зависимого проапоптотического сигналинга, реализующегося в поврежденных нервных клетках при аксотомии.

Научная новизна.

Автор, представленной к защите диссертационной работы, впервые убедительно доказал участие внеклеточного Ca^{2+} и различных Ca^{2+} -каналов в генерации NO в нейронах и глиальных клетках речевого рака при фотодинамическом воздействии. Также Родькин С.В. изучил NF- κ B- и sCG-зависимые механизмы регулирования NO в нервных клетках в условиях фотоокислительного стресса. Была показана роль индуцибельной изоформы NO-синтазы (iNOS) в фотоиндуцированной генерации NO в нейронах и глиальных клетках.

Используя методы иммунофлуоресцентной микроскопии и вестерн-блот анализа, диссертант изучил экспрессию и локализацию p53 при аксотомии в нейронах и глиальных клетках на модели позвоночных и беспозвоночных животных. Впервые изучена NO-зависимая экспрессия проапоптотического белка p53 в клетках дорзальных ганглиев крысы после

перерезки седалищного нерва. Родькин С.В., используя метод TUNEL, установил в своей работе, что NO играет роль негативного регулятора в выживании нервных и глиальных клеток в условиях аксонального стресса, вызванного перерезкой нерва. Также в ходе проведенного диссертационного исследования Родькин С.В. сумел показать накопление С-APP в нуклеоплазме нейронов при аксотомии, предположительно продукта протеолиза С-конца APP – AICD, обладающего проапоптотическим эффектом. Автором диссертационной работы было показано исключительное цитоплазматическое накопление N-APP. Кроме этого, были выявлены механизмы регулирования гистондеацетилазами уровня APP в дорзальных ганглиях крысы при перерезке седалищного нерва. В работе Родькина С.В. также исследована экспрессия и локализация E2F1 в нейронах позвоночных и беспозвоночных животных при аксотомии.

Теоретическая и практическая значимость работы.

В диссертационной работе Родькина С.В. показано участие Ca^{2+} -, sGC- и NF- κ B-сигнальных путей в генерации монооксида азота (NO) в нейронах и глиальных клетках при фотодинамическом воздействии. Представляется достаточно перспективным регулирование активности нейрональной и индуцибельной NO-синтазы через модулирование указанных сигнальных механизмов и оказания таким путём нейропротекторного воздействия в отношении здоровых тканей при ФДТ.

Автором впервые было показано, что при фотоокислительном стрессе важное значение в продукции NO в нейронах и глиальных клетках играют внеклеточный Ca^{2+} , Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны и Ca^{2+} -каналы L-типа, Ca^{2+} -ионофор, Ca^{2+} -АТФаза эндоплазматического ретикулума. Блокирование Ca^{2+} -каналов L-типа нифедипином и Ca^{2+} -каналов цитоплазматической мембраны хлоридом кадмия приводит к снижению фотоиндуцированной генерации NO в нейронах и глиальных клетках. В то же время увеличение внеклеточной концентрации Ca^{2+} , применение Ca^{2+} -

ионофора иономицина, блокирование Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума tBuVHQ сопровождается увеличением генерации NO при ФД-воздействии.

Диссертант доказал в своем исследовании, что фактор транскрипции NF-κB участвует в регуляции уровня NO при ФД-воздействии путем активации индуцибельной NO-синтазы. Для этих целей автором использовались активатор ядерного фактора-κB и его ингибитор, а также селективный блокатор индуцибельной NO-синтазы. Родькиным С.В. также было показано, что растворимая гуанилатциклаза является не только мишенью для NO, но проявляет роль регулятора уровня NO в нейронах и глиальных клетках при фотоокислительном стрессе. Указанные результаты безусловно окажутся полезными при разработке новых нейропротекторных препаратов, которые защитят здоровые ткани при ФДТ опухолей нервной ткани.

Проведенные Родькиным С.В. исследования NO-зависимой экспрессии ключевого проапоптотического белка p53 в нейронах и глиальных клетках дорзальных ганглиев крысы при перерезке седалищного нерва, позволят лучше понять сигнальные механизмы регулирования данного белка в условиях аксонального стресса. Эксперименты показали, что применение NO-донора нитропруссид натрия вызывает депонирование p53 в ядрах клеток аксотомированного дорзального ганглия и усиливает апоптотическую гибель клеток дорзальных ганглиев. В то же время селективный ингибитор iNOS гемисульфат S-метилизотиомочевины оказывает прямо противоположный эффект, проявляя нейропротекторный эффект при перерезке седалищного нерва. В условиях аксонального стресса отмечена ключевая роль ядрышка в регуляции уровня p53 в механорецепторных нейронах при аксотомии.

При исследовании экспрессии и локализации этого белка на моделях позвоночных и беспозвоночных животных отмечаются следующие отличия: в механорецепторных нейронах p53 увеличивался в ядре и цитоплазме, а в

дорзальных ганглиях крысы происходит перераспределение p53 из ядра в цитоплазму. Эти данные дополняют представления о эволюции p-53 сигнальной системы в реализации своих проапоптотических эффектов в клеточном ядре и непосредственно в цитоплазматической области.

Также в исследовании Родькина С.В. показано увеличение экспрессии белка E2F1 в нейронах и глиальных клетках, как позвоночных, так и беспозвоночных животных. Кроме того, отмечено увеличение экспрессии белка APP, уровень которого может регулироваться гистондеацетилазами. Это было доказано в исследовании с помощью неселективного ингибитора гистондеацетилаз вальпроата натрия в дорзальных ганглиях крысы при перерезке нерва. Данные исследования помогают лучше понять тонкие молекулярные механизмы апоптоза, реализующиеся через p53, E2F1 и APP, а также монооксида азота в нейронах и глиальных клетках при травме периферических нервов.

Таким образом, диссертационная работа Родькина С.В., безусловно, имеет теоретическую и практическую значимость. Теоретическая ценность работы заключается в изучении механизмов генерации NO в условиях фотоокислительного стресса, а также роли NO в регулировании уровня p53 и клеточной гибели, экспрессии и локализации p53, E2F1 и APP в нейронах и глиальных клетках позвоночных и беспозвоночных животных при аксотомии, что вносит вклад в общее понимание сигнальных процессов выживания нервных и глиальных клеток в условиях фотодинамического и механического воздействия. Практическая ценность работы заключается в возможности использования применённых в исследовании активаторов и ингибиторов в разработке новых клинически эффективных нейропротекторных средств.

Обоснованность использованных методов.

Поставленные Родькиным С.В. в диссертационной работе цель и задачи потребовали применения соответствующих эмпирических и

аналитических методов, которые были успешно использованы в исследовании. Так экспериментальный комплекс методов включал в себя иммунофлуоресцентную микроскопию, ингибиторно-активаторный анализ, вестерн-блот, микроскопию с использованием флуоресцентного зонда, визуализацию апоптоза с помощью TUNEL, модулирование фотодинамического воздействия, хирургические процедуры по перерезке нерва и выделению дорзальных ганглиев крысы и рецепторов растяжения речного рака. Методы обработки результатов и статистического анализа данных были грамотно подобраны и использованы в диссертационном исследовании Родькина С.В.

Достоверность результатов проведенных исследований.

Достоверность результатов диссертационного исследования Родькина С.В. обусловлена грамотно подобранным комплексом эмпирических и аналитических методов, выполненных на высокотехнологическом лицензированном оборудовании в соответствии с установленными международными протоколами. Работа выполнена при поддержке двух грантов. Многие полученные результаты прошли процедуры рецензирования и опубликованы в престижных международных журналах.

Структура диссертации, соответствие специальности.

Диссертационная работа состоит из 206 печатных страниц и 48 рисунков. Состоит из следующих глав: введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, состоящего из 387 отечественных и зарубежных источников. Диссертационная работа Родькина С.В. полностью соответствует специальности 1.5.4 – Биохимия.

Публикационная активность соискателя и личный вклад, апробация результатов работы.

Родькиным С.В. по результатам диссертационного исследования опубликовано 25 научных работ в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 5 статей – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационного исследования, 7 публикаций входят в базы цитирования Web of Science и Scopus.

Полученные результаты Родькиным С.В. были апробированы на ряде конференций и семинаров. Кроме этого результаты диссертационного исследования внедрены в научно-исследовательскую деятельность неврологического центра ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии», а также используются в педагогической и научно-исследовательской работе факультета «Ветеринарная медицина» ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет».

Автор диссертационного исследования непосредственно участвовал в проведении экспериментальной и аналитической работы и подготовке публикаций по теме диссертационного исследования.

Вопросы, замечания.

Диссертационная работа Родькина С.В. хорошо, добротнo выполнена, но стоит заострить внимание на использовании ряда терминов, которые не совсем подходят в выбранном научном контексте. Также стоит обратить внимание на более лаконичный стиль научного изложения.

К диссертационному исследованию Родькина С.В. у меня имеются следующие замечания.

Замечание общего, фундаментального порядка.

Диссертация С.В. Родькина — пример «чисто биологического» описания исследуемого биологического явления, результатом которого является создание списка большого количества взаимодействующих друг с другом разнообразных белков. Что касается физико-химических механизмов,

лежащих в основе избирательного взаимодействия между этими белками — этот вопрос в диссертации не ставится. То же самое касается физико-химических механизмов действия на живые организмы оксида азота. Диссертант говорит лишь о нейтральных молекулах NO, мишенью действия которых являются только гем-содержащие белки, например, гуанилатциклаза. Между тем, не меньшее влияние на живые организмы оказывают производные нейтральных молекул NO – катионы нитрозония (NO⁺). Мишень их действия - тиоловые группы белков. Результат действия этих катионов на тиоловые группы белков — их S- нитрозирование — трансформация, вызывающая резкое изменение реактивности тиоловых групп белков.

Это замечание никоим образом не умаляет достоинства диссертации С.В. Родькина как широкого и вместе с тем глубокого научного исследования. Мне только хотелось бы, чтобы в будущих своих исследованиях биологии оксида азота диссертант начал бы обращать внимание на физико-химию действия оксида азота на живые организмы.

К минорным замечаниям к диссертации отношу следующее:

1. Почему в исследовании использовались две методики выделения рецепторов растяжения рака?

2. Почему в исследовании в качестве донора оксида азота использовался именно нитропруссид натрия? Кстати, это соединение в живых организмах может выступать донором не только нейтральных молекул NO, но и катионов нитрозония!

3. Насколько специфичным для определения оксида азота является 4,5-диаминофлуоресцеин диацетат? Нет ли здесь «подводных камней»?

Автору диссертационной работы рекомендуется в будущих исследованиях провести иммунофлуоресцентный и вестерн-блот анализ экспрессии нейрональной и индуцибельной NO-синтаз в дорзальных ганглиях крысы при перерезке седалищного нерва, а также иммунофлуоресцентное

исследование данных изоформ NOS в рецепторе растяжения рака при аксотомии и фотодинамическом воздействии.

Все вопросы и замечания нисколько не умоляют достоинства диссертационной работы Родькина С.В. По своему теоретическому и экспериментальному уровню эта работа существенно превосходит многие кандидатские диссертации, так что можно только посоветовать её автору издать материал диссертации в виде отдельной монографии.

Заключение

Диссертационная работа Родькина Станислава Владимировича «Роль монооксида азота и белков клеточной смерти в нервной ткани при повреждении нерва и фотоокислительном воздействии у животных» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, содержащей оригинальное решение актуальной научной задачи по биохимии о роли монооксида азота и проапоптотических белков p53, E2F1, APP в нейронах и глиальных клетках при аксотомии и фотоокислительном воздействии на моделях позвоночных и беспозвоночных животных.

Представленная диссертационная работа полностью соответствует требованиям пунктов 9, 10, 11, 13, 14 Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, с изменениями, внесенными постановлениями правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, 01.10.2018 г. №1168, от 20.03.2021 г. №426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Родькин Станислав Владимирович – заслуживает присуждение ученой степени кандидата наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник,

Федерального Государственного Бюджетного Учреждения Науки
«Федеральный Исследовательский Центр химической физики
им. Н.Н. Семенова Российской академии наук»

доктор биол.наук, профессор



Ванин Анатолий Фёдорович

17 мая 2022

Подпись Ванина А.Ф.
завершено

зам. упр. секр. кхч Ч.С.

Контактная информация:

Адрес: 119991, Москва, ул. Косыгина, 4.

Телефон: 8-985-369-08-03.

E-mail: vanin@polymer.chph.ras.ru

