

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации Шихляровой Аллы Ивановны 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 избранной темы

В настоящее время высоко востребованы экспериментальные исследования, продукт которых представляет большую ценность для развития медицинских и сельскохозяйственных наук, в частности, ветеринарии. Данная работа представляет собой образец глубокого и широкомасштабного исследования патогенетических механизмов повреждения нервной ткани – одного из актуальных направлений, напрямую затрагивающего как экономические сельскохозяйственные ресурсы, так и опосредованные медико-онкологические аспекты. И это не случайно.

На сегодняшний день онкологические заболевания нервной системы и нейротравмы являются распространённой причиной смерти и инвалидности животных во всем мире. Адекватно тому, что Россия занимает одно из лидирующих мест по количеству домашних животных, отмечается высокая частота злокачественных новообразований нервной системы и травм периферических нервов, зачастую с их полным разрывом. В связи с возросшими масштабами нейропатологии у сельскохозяйственных животных, не трудно понять дальнейшую цепь ожидаемых событий - прерывание сельскохозяйственного цикла и возрастание экономического урона.

В экспериментальной онкологии, в частности в исследованиях Ростовского онкоцентра, убедительно доказана связь между повреждением нервной ткани, развитием хронической нейрогенной боли и стимуляцией роста опухоли. Установлено, что боль, возникающая до манифестации опухоли, а затем, стимулирующая её рост, детерминирует нарушения на всех иерархических уровнях, вплоть до молекулярно-геномного. Более того, агрессивные факторы противоопухолевого лечения, в том числе радиотерапия или ФДТ, обладают повреждающими побочными эффектами, вовлекая и здоровые ткани.

Не используя в своей работе модели опухолевого роста, диссертант вплотную подходит к разработке и пониманию механизмов повреждения нервной ткани у животных и возможности его купирования. Это актуально и высоко востребовано из-за отсутствия на сегодняшний день арсенала эффективных нейропротекторных препаратов, способных защитить нейроны и глиальные клетки от гибели. Автор отрабатывает логику своего методологического подхода, где основными молекулярными мишенями для нейропротекции и выживания нейронов и глиальных клеток при травмах и ФД-воздействии выступают монооксид азота (NO) и проапоптотические белки, такие как белок предшественник бета-амилоида APP, опухолевый супрессор p53 и фактор транскрипции E2F1. До настоящего времени эти вопросы оставались малоизученными и недостаточно полно освещенными. Кроме того, выявляется спорный характер представлений о роли NO при травме нерва, а также регуляции, экспрессии и локализации проапоптотических белков в условиях аксонального стресса. Таким образом, актуальность данного исследования несомненна.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций.

Диссертационная работа Родькина С.В. является завершенным научным исследованием, выполненным в ФГБОУ высшего образования «Донской государственной технической университет» (ректор – доктор технических наук, профессор Месхи Бесарион Чохоевич).

Научные положения основываются на современной информационной базе источников литературы и собственных исследованиях, соответствующих паспорту специальности 1.5.4 – Биохимия. Достоверность полученных результатов исследований обеспечена использованием арсенала адекватных методик на высокотехнологическом лицензированном оборудовании, включая иммунофлуоресцентную микроскопию, ингибиторно-активаторный анализ, вестерн-блот, микроскопию с использованием флуоресцентного зонда, визуализацию апоптоза с помощью TUNEL. Методические подходы к реализации в эксперименте фотодинамического воздействия и аксотомии полностью соблюдены. Стоит отметить, что исследования были проведены в рамках грантов: Проект № БЧ0110 - 11/2017 - 22 «Сигнальные механизмы регуляции выживания и смерти сенсорных нейронов и глиальных клеток беспозвоночных и млекопитающих животных при повреждении нервов», Гос. Задание №0852/2020 - 0028 "Биохимические и молекулярно-генетические исследования механизмов патологических процессов, ассоциированных с социально – значимыми заболеваниями". Такого рода тематические

базовые исследования в значительной мере подкрепляют достоверность научных положений, выводов и рекомендаций выполненной диссертации. Работа выстроена логично. Задачи исследования в полной мере соответствуют поставленной цели и раскрыты в ходе диссертационного исследования. Для статистической обработки полученных результатов применялись современные методики анализа данных, которые послужили для доказательной формулировки положений, грамотных выводов и рекомендаций.

Научная новизна исследования и достоверность полученных выводов и результатов диссертации

Диссертационная работа, выполненная Родькиным С.В., характеризуется высоким уровнем новизны, которая раскрыта в ее содержании, а также многочисленных публикациях, часть из которых входит в высококвартильные журналы, материалы международных конференций и съездов.

По результатам работы были получены ранее неизвестные данные об установлении зависимости между фотоиндуцированной генерацией NO в нейронах и глиальных клетках и вне- и внутриклеточными факторами тканевого гомеостаза. Доказано, что к факторам, повышающим генерацию NO, относится 4-х кратное повышение внеклеточной концентрации Ca^{2+} , использование Ca^{2+} - ионофора иономицина, блокирование Ca^{2+} -АТФ-азы эндоплазматического ретикулума, активация ядерного фактора Карра В. Напротив, при блокировании кальциевых каналов, а также ингибировании ядерного фактора kB, индуцибельной NO-синтазы и гуанилатциклазы отмечается угнетение генерации монооксида азота. Эти новые данные существенно расширяют современные научные представления о возможности управления патогенетическими механизмами фотоокислительных процессов и доступности корректирующего влияния на сигнальные точки при повреждении нервной ткани.

Можно утверждать, что при использовании другой экспериментальной модели – аксотомии, автору удалось повысить степень новизны благодаря изучению NO-зависимых механизмов экспрессии ключевого проапоптотического белка p53 в клетках дорзальных ганглиев крысы, а также NO-детерминированных процессов проапоптотической гибели нейронов и глиальных клеток при перерезке седалищного нерва. Автор впервые сумел показать, что аксотомия вызывает увеличение экспрессии и ядерно-цитоплазматическое перераспределение p53, APP и E2F1 в нейроглиальных моделях позвоночных и беспозвоночных животных, что позволило обнаружить

связующую нить проапоптических процессов в рамках механизма повреждения и гибели нейронов и окружающих глиальных клеток, а также поиска путей предотвращения патологических изменений. В силу этого можно оценить высокую теоретическую и прикладную значимость диссертации.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Полученные в диссертационном исследовании данные имеют прикладное значение, так как открывают новые возможности для улучшения результатов предотвращения развития патологических синдромов. Развитие такого направления в науке позволяет целенаправленно подходить к регуляции индуцированной генерации NO в нейронах и глиальных клетках, а также учитывать одну из ключевых ролей NO при апоптозе этих типов клеток в условиях аксонального повреждения.

Выявляется заинтересованность в первую очередь таких отраслей, как травматология, онкология, ветеринария, поскольку фармакологическая модуляция сигнальных путей представляет потенциально эффективный терапевтический способ позволяющий снизить негативное ФД воздействие на здоровую нервную ткань. Кроме того, изученные диссертантом при аксональном стрессе проапоптотические белки могут стать терапевтической мишенью при борьбе за выживание поврежденных нейронов и глиальных клеток в результате нейротравмы. Следовательно, использованные автором ингибиторы и активаторы могут помочь в разработке эффективных нейропротекторных препаратов.

Общая характеристика работы

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертационная работа Родькина С.В. изложена на 206 страницах машинописного текста и имеет традиционную структуру, состоит из введения, 4-х глав, включающих обзор литературы, характеристики материала и методов, результатов собственных исследований, отдельной главы обсуждения, итогового заключения, выводов, практических рекомендаций. Библиографический указатель содержит 387 отечественных и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 48 рисунками.

Во введении отражены все требуемые данные, дающие представления об актуальности темы исследования и степени ее разработанности, которая обосновывается современными статистическими показателями по росту численности домашних и сельскохозяйственных

животных, травматизации и опухолевого поражения, затрагивающих нервную ткань. Сформулирована рабочая гипотеза, цель и задачи исследования. Дана трактовка положений, выносимых на защиту, новизны исследования и его практической значимости. Результаты работы полностью отражены в 25 публикациях в журналах и материалах международных и отечественных форумов, 5 статей опубликовано в журналах, рецензируемых ВАК РФ, 7 публикаций входят в базы цитирования Web of Science и Scopus.

Обзор литературы свидетельствует о достаточно полной осведомленности автора в основных вопросах и направлениях разрабатываемой темы. Глава занимает большой объём в 43 страницы. Достаточно полно раскрыта роль монооксида азота как сигнальной молекулы в нервной ткани при физиологических и патологических условиях. В главе логически верно представлены особенности патогенетических изменений в NO-системах организма, характеризующие развитие повреждений при ФДТ и нейротравме, затрагивающей череп, спинной мозг, периферические нервы. В целом, обзор написан в сравнительном стиле грамотным языком с использованием современных литературных источников, что свидетельствует об осведомленности и компетентности автора. Подавляющее большинство цитируемых в обзоре работ принадлежит перу зарубежных авторов за период последних 5 – 7 лет.

Глава 2 посвящена подробной характеристике модельных объектов исследования, в качестве которых использованы абдоминальные механорецепторные нейроны речного рака с сателлитными глиальными клетками, а также сенсорные нейроны, функционально и анатомически связанные с седалищным нервом лабораторной крысы. Автор творчески подошел к иллюстрации моделей, создав собственную схему объектов исследования и проведения экспериментов с ФД-воздействием и аксотомии. Для лучшего восприятия метода фотоиндуцированной генерации NO помимо текста включены рисунки. Разносторонность методов исследования и корректная обработка статистических данных, позволяет считать методический уровень адекватным поставленной цели и задачам.

В главе 3 изложены все непосредственные результаты исследований, объединяющие как экспериментальные модели, так и все многообразие критериев оценки динамики генерации NO, развития апоптоза. В силу отсутствия необходимости осуществлять перечень всех представленных на 48 страницах результатов, представляется возможным *связать эти результаты с основными положениями, которые автор выносит на защиту, как квинтэссенции научной работы.*

Итак, *первое положение* гласит, что целый ряд факторов, а именно, повышенный внеклеточный Ca^{2+} , Ca^{2+} -ток через цитоплазматическую мембрану, Ca^{2+} -АТФаза эндоплазматического ретикулума, растворимая гуанилатциклаза и индуцибельная NO-синтаза модулируют фотоиндуцированную генерацию NO в нейронах и глиальных клетках беспозвоночных животных. Для доказательства этого положения автор приводит результаты экспериментов на основе измерения уровня флуоресценции NO - чувствительного зонда в соме, аксоне, дендритах нейрона и глиальных клетках при ФД-воздействии в различные временные точки, статистически подтверждая прямую связь генерации монооксида азота с данными факторами по графическим кривым интенсивности флуоресценции (рис. 13-24). *Второе положение* о том, что NO влияет на экспрессию и локализацию p53 в нейронах и нейроглии, а также на апоптотическую гибель этих клеток при аксотомии позвоночных животных, диссертант подкрепляет данными, полученными при регистрации апоптотических нейронов и глиальных клеток в дорзальных ганглиях крысы после перерезки седалищного нерва, используя метод TUNEL и применяя доноры и ингибиторы NO. Автор констатирует, что в условиях аксотомии в периоде от 1-х до 7-ми суток регистрируется активация апоптоза, который под влиянием NO-донора SNP усиливается, а ингибитора индуцибельной NO-синтазы SMT – ослабевает. Кроме того, эти же факторы диаметрально противоположно изменяют ядерно-плазменное содержание p53, что имеет отношение уже к *третьему положению*.

Четвертое положение гласит, что аксотомия индуцирует экспрессию E2F1 и APP в нейронах речного рака и дорзальных ганглиях крысы, а гистондеацетилазы (HDACs) регулируют уровень APP. Сопоставляя данные вестерн-блот анализа с результатами иммунофлуоресцентной микроскопии, диссертанту удается установить не только однотипную картину увеличения уровня E2F1 и APP в нейронах рецептора растяжения рака и ганглиях корешков спинного мозга крысы (DRG), но и найти различие между аксотомированными объектами в распределении экспрессированных белков. Тем самым подтверждается концептуальный подход диссертанта о существовании молекулярно-клеточных механизмов, контролирующих генерацию NO в нейронах и глиальных клетках как при фотоокислительном стрессе, так и механизмов экспрессии и локализации p53 при аксотомии. В качестве дополнительного доказательства регуляторного влияния на процесс апоптоза и внутриклеточной сигнализации в аксональных процессах, автор приводит данные о влиянии ингибитора гистондеацетилазы вальпроата натрия, который снижает экспрессию APP через 7 суток после аксотомии.

В главе 4 проводится обсуждение полученных результатов. Это важный раздел работы, в котором диссертант творчески подошел к пониманию наблюдаемых изменений и выявил связующие нити молекулярных механизмов, определяющих роль монооксида азота и белков апоптотических процессов в нервной ткани при фотоокислительных и прямых повреждающих воздействиях. Необходимо особо отметить, что целенаправленный анализ собственных результатов умело сопоставляется с известными данными других ученых по ссылкам на источники последних лет. Глава читается как детектив с большим интересом и демонстрирует научную компетенцию автора по данной теме.

Заключение и выводы соответствуют поставленным задачам и полностью отражают содержание диссертационной работы.

В то же время есть некоторые замечания по данной работе. Так, в обзоре литературы желательно больше осветить вопросы на тему изучения NO и P53, в том числе при перерезке седалищного нерва, методов профилактики нейрогенной боли и коморбидных состояний в отечественных экспериментальных исследованиях, что актуально для лечебной практики у животных. Кроме того, конец обзора логично было бы завершить формированием представления о целесообразности авторских исследований. В разделе методического характера отсутствуют сведения о количестве экспериментальных животных, при этом, ошибочно указан вес 2 - 2,5-месячных крыс, вдвое превышающий нормативные показатели. Безусловно перегружена информацией 3 глава, которая даже по смыслу подразделяется на две самостоятельные части: ФДТ и хирургическая травма – аксотомия. Её 15 подразделов утяжеляют структуру главы и целостное восприятие первичного материала. К пожеланиям относится также более доказательная формулировка выводов, в которых, к сожалению, отсутствует подкрепляющая статистическая база с уровнем достоверности различий. Практические рекомендации могли быть составлены в более конкретном указании используемых активаторов и ингибиторов в отношении нейропротекторных препаратов.

Также хотелось уточнить: 1. Насколько специфичен метод TUNEL для определения апоптотической гибели клеток? Номенклатурный комитет по гибели клеток рекомендует использовать как минимум два независимых показателя для определения пути гибели клеток.

2. Почему в исследовании по ФД-воздействию используется именно фотосенсибилизатор Фотосенс? Приведенные замечания не снижают оценки качества диссертационной работы и не являются принципиальными. Автореферат полностью отражает основное содержание диссертационной работы.

Заключение

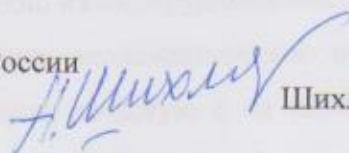
Диссертационная работа Родькина Станислава Владимировича «Роль монооксида азота и белков клеточной смерти в нервной ткани при повреждении нерва и фотоокислительном воздействии у животных» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, содержащей оригинальное решение актуальной научной задачи в области биохимии, связанной с ролью монооксида азота и белков клеточной смерти в нервной ткани позвоночных и беспозвоночных животных при фотоокислительном воздействии и повреждении нерва.

Представленная диссертационная работа полностью соответствует требованиям пунктов 9 - 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» Постановления правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (в редакции Постановления 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.

Согласна на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник
ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России
Доктор биологических наук, профессор



Шихлярова А.И.

« 23 » мая 2022 г.

Подпись доктора биологических наук, Шихляровой Аллы Ивановны «заверяю»

Ученый секретарь
ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России
Доктор биологических наук, доцент



Дженкова Е.А.

Контактная информация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. (ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России). 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037; тел./факс: 8(863) 300-30-05, e-mail: onko-sekretar@mail.ru