

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт
высшей нервной
деятельности и
нейрофизиологии Российской
академии наук, профессор
РАН, д.б.н. Малышев Алексей
Юрьевич

19 мая 2022



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук» 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

Исследования и диссертационная работа Родькина С.В. направлены на изучение внутриклеточных сигнальных механизмов, обеспечивающих выживание нейронов и глиальных клеток в условиях повреждения нервных путей и фотоокислительного стресса. Регистрируемый в статистической отчетности рост числа домашних питомцев требует новых подходов в терапии травмы периферической нервной системы и онкологических заболеваний, которые являются одной из главных причин инвалидности и смертности животных-компаньонов. Не менее актуальна данная проблематика и в отношении, сельскохозяйственных животных.

Фотодинамическая терапия, в основе которой лежит генерация сильного фотоокислительного стресса, является на сегодняшний день перспективным методом лечения опухолевых процессов. Вызванная действием света и фотосенсибилизаторов деструкция патологической ткани чаще всего сопряжена с гибелью и здоровых клеток. Авторитетные научные исследования указывают на особую роль монооксида азота (NO), который может влиять как положительно, так и отрицательно на выживание опухолевых клеток после фотодинамического воздействия. Однако, значение NO в процессах регуляции клеточной гибели и устойчивости остается не до конца выясненной, как и сигнальные механизмы, запускающие его генерацию при фотоокислительном стрессе.

Активация сигнальных путей запуска при травмах периферической нервной системы (например, при разрыве периферических нервов) является актуальной темой, детально изученной в представленном исследовании. Такого рода патологии характеризуются изменением метаболизма NO и проапоптотических белков: предшественника бета-амилоида (APP) и факторов транскрипции E2F1 и p53. Выдвигается предположение, что NO может выступать в качестве одного из модуляторов активности вышеуказанных белков. Детальное понимание вовлеченности NO в обеспечение жизнеспособности клеток при аксотомии пока отсутствует. Некоторые авторы приписывают ему положительное влияние, которое поддерживает регенерацию клеток. Другие исследователи, напротив, считают, что NO может вызывать дегенерацию нейронов. Данные по изучению NO-зависимого регулирования уровня белка p53 в нервной системе при нейротравмах, практически отсутствуют. Слабо изучены и механизмы его экспрессии и локализации при аксотомии.

Следует отметить, что в своей работе автор подчеркивает также важность изучения белка E2F1, который играет значительную роль в регуляции апоптотических процессов. Способность E2F1 запускать апоптоз связывают с индукцией транскрипции p53. Ранее было показано, что NO, в свою очередь, может принимать участие в регуляции экспрессии E2F1,

однако механизмы экспрессии и локализации белка E2F1 в условиях аксонального стресса нуждаются в дальнейшем изучении.

Отдельная ветка исследований посвящена изучению APP - эволюционно консервативного белка, который играет важную роль в различных клетках организма человека и животных. Литературные источники, раскрывающие роль APP при аксотомии, скорее малочисленны, а полученные результаты зачастую носят противоречивый характер. В регулировании уровня APP могут принимать участие как NO, так и белок p53 посредством репрессирования промотора его гена. Что касается сигнальных механизмов, лежащих в основе регулирования уровня APP в нейронах при аксотомии, то они остаются практически не изученными. Поэтому так важно исследование механизмов его экспрессии и локализации при травмах нервов.

Научная новизна

Уникальная модель с использованием беспозвоночных животных (речного рака) позволила автору представленной диссертационной работы впервые продемонстрировать активное участие Ca^{2+} в модуляции фотоиндуцированной генерации NO в нейронах и глиальных клетках. При этом повышение внеклеточной концентрации Ca^{2+} , применение Ca^{2+} -ионофора, блокирование Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулула, активация NF- κ B сопровождалась увеличением продукции NO при ФДТ, а блокада кальциевых каналов плазматической мембраны и ингибирование NF- κ B, iNOS, sGC приводили, соответственно, к уменьшению фотоиндуцированной генерации NO в нейронах и глиальных клетках речного рака.

Дополнительно в диссертационной работе Родькина С.В. на моделях с использованием позвоночных и беспозвоночных животных методами иммунофлуоресцентной микроскопии и вестерн-блот анализа впервые подробно изучены экспрессия и локализация проапоптотического белка p53, а также механизмы NO-зависимого регулирования его в нервной ткани. Методом TUNEL Родькиным С.В. определена роль NO и iNOS в

проапоптотической гибели нейронов и глиальных клеток при перерезке аксона.

Кроме этого, автором диссертационной работы были установлены механизмы регулирования гистондеацетилазами уровня APP, его экспрессия и локализация в механорецепторных нейронах рака при аксотомии и дорзальных ганглиях крысы при перерезке седалищного нерва. Также исследована экспрессия E2F1 в нейронах позвоночных и беспозвоночных животных при аксотомии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Уточнение сигнальных путей генерации NO в нейронах и глиальных клетках при фотоокислительном стрессе, развивающемся во время ФДТ, является основным теоретическим вкладом диссертационной работы Родькина С.В. в понимание биохимических процессов, в которые оказываются вовлечены внеклеточный Ca^{2+} , Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны и Ca^{2+} -каналы L-типа, Ca^{2+} -ионофор, Ca^{2+} -АТФаза эндоплазматического ретикулума.

В своей работе соискатель убедительно показал участие фактора транскрипции NF- κ B в продукции NO посредством активации индуцибельной изоформы NO-синтазы. В то же время показано, что ингибирование sGC сопровождается снижением продукции NO в фотосенсибилизированных нейронах и глиальных клетках во время их облучения.

Полученные результаты, в перспективе, будут полезны при разработке новых препаратов для защиты здоровых тканей при проведении фотодинамической терапии онкологических заболеваний нервной системы. Важные результаты получены Родькиным С.В. при исследовании NO-зависимых механизмов экспрессии проапоптотического белка p53 в клетках дорзальных ганглиев крысы при перерезке седалищного нерва. Экспериментальные данные показывают, что применение NO-донора вызывает накопление белка p53 в ядрах клеток аксотомированного

дорзального ганглия и усиливает, соответственно, гибель данных клеток. Введение селективного ингибитора iNOS приводило к обратному эффекту.

Автор, изучая экспрессию и локализацию белка p53 при аксотомии на моделях позвоночных и беспозвоночных животных, показал, что в нейронах дорзальных ганглиев крысы происходило ядерно-цитоплазматическое перераспределение p53, а в механорецепторных нейронах речного рака уровень p53 увеличивался в ядре и цитоплазме.

Также диссертантом было показано увеличение экспрессии белков E2F1, APP в нейронах и глиальных клетках при аксотомии. Родькиным С.В. было продемонстрировано, что APP присутствует не только в нервной системе беспозвоночных животных, но и у ракообразных, подтверждая тем самым консервативную природу этого белка. Полученные данные свидетельствуют, что E2F1 и APP играют важную роль в процессах апоптоза при аксотомии.

Исходя из всего вышеизложенного, можно считать, что теоретическая ценность диссертация Родькина С.В. заключается в том, что она позволяет лучше представить биохимические механизмы выживания и гибели нейронов и глиальных клеток при повреждении нервов, а также при фотоокислительном стрессе. Практическая ценность работы лежит в области разработки новых эффективных в клинической практике препаратов нейропротективного действия.

Обоснованность использованных методов

Для решения поставленных в диссертационной работе Родькина С.В. цели и задач были проведены эксперименты на моделях ФД-воздействия и аксотомии позвоночных и беспозвоночных животных по классическим методикам.

Экспериментальная часть исследования включала широкий спектр методов: иммунофлуоресцентную микроскопию, ингибиторно-активаторный анализ, вестерн-блот, микроскопию с использованием флуоресцентного зонда, визуализацию апоптоза с помощью TUNEL, фотодинамическое воздействие, аксотомии. Статистический анализ экспериментальных данных

выполнен на должном уровне. Методические подходы, использованные диссертантом при подготовке диссертации, подобраны корректно и их применение обосновано, свидетельством чего является успешно проведенная работа и полученные результаты.

Достоверность результатов проведенных исследований

О достоверности представленных диссертантом результатов работы свидетельствует репрезентативность экспериментальной выборки животных, на которых была проведена эмпирическая часть исследования по классическим методикам в соответствии с установленными российскими и международными нормами на лицензированном оборудовании, с дальнейшей правильной статистической обработкой и анализом полученных данных. Необходимо отметить, что исследования проводились в рамках двух грантов. Статьи по теме диссертации публиковались в известных российских и международных журналах.

Структура диссертации, соответствие специальности

Диссертационная работа представлена на 206 страницах, в ней имеется 48 рисунков и состоит из 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. соответствует специальности 1.5.4 – Биохимия.

Публикационная активность соискателя и личный вклад, апробация результатов работы

По материалам диссертации Родькин С.В. опубликовал 25 печатных 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. Результаты диссертационного исследования Родькина С.В. внедрены в научно-исследовательскую деятельность неврологического центра ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии». Также они используются в педагогической и научно-исследовательской работе факультета «Ветеринарная медицина» ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет».

Автор принимал непосредственное участие в сборе и обработке данных научных литературных источников по теме диссертации, подготовке и проведении экспериментов, анализе полученных результатов и подготовке их к публикации.

Вопросы, замечания

Критически значимых вопросов и замечаний по работе не имеется. Тем не менее, хотелось в качестве дискуссии обсудить следующее: в литературном обзоре детально описаны особенности биохимических каскадов в разных локациях в мозгу, и здесь встает вопрос как локальные особенности поддержания уровня NO связаны с функционалом разных отделов мозга?

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, посвященной роли различных сигнальных путей в фотоиндуцированной генерации NO при фотодинамическом воздействии, а также NO-зависимым механизмам регулирования p53 и клеточной гибели, экспрессии и локализации проапоптотических белков в нервной системе при повреждении периферических нервов.

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.

Отзыв подготовлен заведующим лабораторией физиологии сенсорных систем, профессором РАН, д.б.н. Бондарем Игорем Вечеславовичем.

Диссертационная работа и отзыв обсуждены на заседании лаборатории физиологии сенсорных систем от 19 мая 2022 г. протокол № 1.

Председатель
Заведующим лабораторией
физиологии сенсорных систем
ФГБУН ИВНД и НФ РАН
д.б.н

Подпись т. Бондаря И.В.
УДОСТОВЕРЯЮ
Зав. кабин. ИВНД и НФ
Кузнецова И.И.
Бондарь Игорь Вечеславович

Секретарь
старший научный сотрудник
лаборатории физиологии
сенсорных систем
ФГБУН ИВНД и НФ РАН
к.б.н

Подпись т. Салтыкова К.А.
УДОСТОВЕРЯЮ
Зав. кабин. ИВНД и НФ
Кузнецова И.И.
Салтыков Константин Альбертович

Адрес: 117485, г. Москва, ул. Бутлерова, 5а. Телефон: 7 (495) 334-70-00
email: admin@ihna.ru