



9.12.2021

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Лопачева Александра Васильевича на тему: «Исследование механизмов нейротоксического действия кардиотонических стероидов убаина, дигоксина и буфалина на первичную культуру нейронов крысы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Поиск новых механизмов нейродегенерации – одна из наиболее актуальных задач современной нейробиологии. Сложность патогенеза нейродегенеративных заболеваний состоит в том, что в большинстве случаев, механизмы развития даже отдельно взятого заболевания включают в себя нарушение работы многих внутриклеточных сигнальных систем, доменов и белковых комплексов. В обзоре литературы своей диссертационной работы Лопачев А.В. описывает известные факты о том, что нарушения работы Na^+ , K^+ -АТФазы могут приводить к развитию неврологических заболеваний. Также приводятся данные о том, что кардиотонические стероиды (КТС) могут присутствовать в организме млекопитающих, в том числе, в головном мозге, а их количество может изменяться при различных патологиях. Хорошо известно, что работа Na^+ , K^+ -АТФазы жизненно важна для животных клеток, тем более, нейронов. Соискатель приводит данные литературы о том, что полностью ингибирующие активность Na^+ , K^+ -АТФазы концентрации убаина вызывают гибель нейронов и механизм данного процесса весьма очевиден. В то же время, Лопачев А.В. ставит вопрос о том, что будет происходить с нейронами, если уменьшать концентрацию КТС настолько, чтобы происходило лишь частичное ингибирование функции Na^+ , K^+ -АТФазы. В контексте того, что функция данного фермента может страдать при воздействии различных негативных факторов (окислительный стресс, митохондриальная недостаточность, агрегаты α -синуклина и β -амилоида и др.), а также эндогенных КТС, изучение нейротоксичности КТС, а также механизмов, лежащих в основе этого процесса, представляется актуальной темой, как одним из подходов к изучению нейродегенеративных процессов.

Тот факт, что КТС могут оказывать токсическое воздействие на разные типы клеток млекопитающих известен достаточно давно. Также было показано, что убаин может вызывать активацию MAP-киназы ERK1/2 в различных типах клеток, в том числе, нейронах. Однако, предыдущие исследования установили лишь отдельные факты о влиянии убаина на жизнеспособность нейронов и активацию ряда киназ. В данной диссертационной работе, впервые проведен детальный анализ механизмов токсичности трех КТС: убаина, дигоксина и буфалина. В большинстве исследований, посвященных изучению влияния КТС на нейроны и ЦНС в целом, использовался только убаин. В представленной диссертационной работе детально исследовано влияние широкого диапазона концентраций исследуемых КТС на спектр MAP-киназ: ERK1/2, p38, JNK в нейронах, а также исследованы механизмы активации данных киназ и связь с нейротоксичностью КТС. Более того, в данной диссертационной работе проведен

анализ взаимосвязи между степенью ингибирования Na^+, K^+ -АТФазы разными концентрациями КТС, их нейротоксичностью и влиянием на активацию MAP-киназ. Данный подход позволил исследователю получить новые данные о влиянии КТС на нейроны, выявить новые механизмы уже известных и составить более общую картину влияния КТС на нейроны, чем предыдущие исследования, по крайней мере, в таком модельном объекте, как первичная культура.

Использованные при выполнении диссертационной работы методы позволяют качественно, на современном уровне решить поставленные задачи.

Раздел «результаты и обсуждение» включает себя пять логически связанных глав, материал которых отражает решение поставленных соискателем задач и соответствует сделанным пяти выводам. Объединение раздела «результаты» с разделом «обсуждение» облегчает восприятие логических переходов между главами диссертации. В первой главе раздела «результаты и обсуждение» описано сравнение нейротоксического эффекта разных концентраций КТС при разных временах инкубации, а также влияние на соотношение белков-регуляторов митохондриального пути апоптоза семейства Bcl-2. Раздел стоило бы дополнить оценкой того, каким именно путем (апоптоз или некроз) гибнут нейроны культуры при воздействии минимальных токсичных концентраций КТС. Например, при помощи измерения активности эффекторных каспаз. Однако это пожелание не влияет на закономерность сделанного из данного раздела вывода и качество исследования в целом.

Во второй главе раздела «результаты и обсуждение» описано влияние КТС на активность Na^+, K^+ -АТФазы в микросомальном препарате больших полушарий головного мозга крыс. Построенные кривые ингибирования позволяют оценить константы ингибирования разных изоформ Na^+, K^+ -АТФазы, которые присутствуют в мозге, а также соотношение активности данных изоформ. Хотя в рамках данной работы соискатель провел сравнение соотношения изоформ α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы в лизате первичной культуры нейронов крысы и микросомальном препарате, в будущих исследованиях стоит дублировать измерение активности фермента на живой культуре (например, по количеству транспортируемого радиоактивного Rb^+), поскольку клетка – более сложная система, чем мембранный препарат, и активность фермента в ней может быть отлична от таковой в мембранном препарате даже при сохранении соотношения общего количества белка.

В третьей главе раздела «результаты и обсуждение» описано подробное исследование концентрационной и временной зависимостей влияния уабаина, дигоксина и буфалина на активацию MAP-киназ ERK1/2, p38 и JNK в первичной культуре нейронов крысы. Данные главы раскрывают различия между влиянием разных КТС на активацию трех MAP-киназ. В данной главе соискатель демонстрирует, что важно не только показать активацию какого-то сигнального каскада при воздействии определенного стимула, но исследовать процесс во времени и в зависимости от силы стимула (например, концентрации вещества). Такой подход значительно повышает качество выполненной работы.

В четвертой главе раздела «результаты и обсуждение» соискатель описывает давние о различиях в механизмах активации MAP-киназ при воздействии уабаина на первичную культуру нейронов при разных временах инкубации. Полученные данные раскрывают роль Ca^{2+} в механизмах активации MAP-киназ при воздействии уабаина, а также взаимную зависимость активации этих сигнальных каскадов.

В пятой главе раздела «результаты и обсуждение» описано какие из внутриклеточных сигнальных механизмов, на активность которых влияет уабаин, связаны с токсичностью КТС для нейронов первичной культуры. Одним из ключевых результатов данной работы является то, что именно долговременная активация ERK1/2 при воздействии уабаина связана с его нейротоксичностью. Однако, в работе не

раскрыт вопрос о том, почему дигоксин нейротоксичен в меньших концентрациях, чем убаин, при том, что имеет большие константы ингибирования, но не вызывает активацию ERK1/2 при воздействии меньших концентраций и не вызывает большей длительности активации ERK1/2. Возможно существуют и другие механизмы от которых зависит нейротоксичность КТС? Но это скорее не замечание, а предложение для будущих исследований, поскольку отсутствие ответа на данный вопрос не нарушает логики работы и сделанных выводов.

В данной диссертационной работе, впервые проведен детальный анализ механизмов токсичности трех КТС: убаина, дигоксина и буфалина. Результаты и основные заключения работы выглядят достоверными и логичными, соответствуют изложенному в опубликованных в рецензируемых и индексируемых в WoS (4), Scopus (4), ВАК (1) журналах статьям, материал которых вошел в данную кандидатскую диссертацию. Выводы работы полностью обоснованы и логически следуют из результатов.

Результаты, описанные в диссертации Лопачева А.В., раскрывают новые аспекты влияния разных КТС на внутриклеточные сигнальные каскады в нейронах. Изучение последствий нарушения работы Na^+, K^+ -АТФазы в нейронах, как одного из стимулов, запускающих процесс нейродегенерации имеет важное значение для исследования патогенеза заболеваний ЦНС.

Диссертация Лопачева Александра Васильевича на тему: «Исследование механизмов нейротоксического действия кардиотонических стероидов убаина, дигоксина и буфалина на первичную культуру нейронов крысы» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Лопачев Александр Васильевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия. Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушены.

Член Диссертационного Совета

Доктор медицинских наук, PhD, Honorary Senior Research Fellow,
Division of Biomedicine, Cardiff University, United Kingdom



Нинкина Наталья Николаевна

9.12.2021