

ОТЗЫВ

председателя 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

Актуальность темы исследования

Кардиотонические стероиды (КТС) или сердечные гликозиды – ряд структурно-родственных соединений, первоначально полученных из растений и с давних пор применяемых в медицине; механизм действия этих соединений связан с их способностью выступать в роли специфических ингибиторов Na, K-ATPase . Хотя в последнее время создаются новые средства для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, КТС остаются востребованными в медицинской практике и назначаются пациентам с хронической сердечной недостаточностью, пароксизмальными тахикардиями и другими видами патологии, используются для контроля частоты сокращений желудочков при постоянной форме фибрилляции предсердий. Частота применения КТС повысилась и в связи с распространением новой коронавирусной инфекции, обусловившей серьезное ухудшение здоровья пациентов с патологиями сердечно-сосудистой системы, перенесших COVID-19. Поэтому исследование биохимических механизмов побочных эффектов сердечных гликозидов остается актуальной задачей медико-биологических исследований. Молекулярные основы реализации биологической активности КТС изучались на протяжении многих десятилетий, как и механизмы их токсических эффектов. Однако, эти работы были направлены, в основном, на анализ действия КТС на клетки сердечно-сосудистой и выделительной систем. Эффекты сердечных гликозидов на функции клеток ЦНС остаются относительно малоизученными и нуждаются в дальнейшем исследовании, так как проблема побочных эффектов КТС, проявляющихся в развитии у пациентов различных видов патологии, связанной с нарушениями деятельности нервной системы, в частности депрессиями, психозами и пр., остается нерешенной. Также важным научным направлением является характеристика воздействия эндогенных КТС на клетки нервной системы, изучение регуляции активности и биосинтеза этих соединений в мозге. Роль нарушения функционирования $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ – мишени действия КТС - в патофизиологических процессах в центральной нервной системе тоже является не до конца раскрытой. Поэтому тематика рассматриваемой работы является актуальной.

Степень обоснованности научных положений и выводов

Приведенные в рассматриваемом диссертационном исследовании заключение и выводы обоснованы, логично следуют из полученных результатов. При выполнении исследования диссертантом были использованы современные, адекватные поставленным целям и задачам, методы. Достоверность полученных данных подтверждается результатами статистической обработки, проведенной с помощью корректных подходов. Работа прошла апробацию на различных уровнях, результаты диссертационного исследования излагались на международных и российских конференциях, а также были опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Из пяти опубликованных по материалам диссертации статей – 4 статьи в журналах,

индексируемых в наукометрической базе Web of Science Core Collection, причем, одна статья - в журнале первого квартиля. В целом, научные положения и выводы в диссертационной работе Лопачева А.В. можно считать корректными и доказанными.

Оценка научной новизны исследования

Несмотря на многолетнюю историю использования сердечных гликозидов в медицине, ряд аспектов их действия на организм требует дополнительного исследования, в частности, остаются малоизученными биохимические основы их эффектов на функции ЦНС, поэтому результаты диссертационного исследования, несомненно, имеют научную новизну. Впервые на избранной экспериментальной модели с использованием культивируемых нейронов крыс проведен сравнительный анализ нейротоксичности ряда КТС - убаина, дигоксина и буфалина. Получены новые данные, демонстрирующие связь между вызываемыми КТС изменениями активации MAP-киназ, (ERK1/2, p38, JNK) и их нейротоксичностью. Установлено, что снижение жизнеспособности культивируемых нейронов под действием убаина в токсической концентрации (10 мкМ), связано не с увеличением концентрации ионов кальция в цитоплазме нейронов, а с продолжительной активацией протеинкиназы ERK1/2, в то время как активация p38 и угнетение активации JNK в нейронах при ингибировании $\alpha_2+\alpha_3$ изоформ α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы убаином зависят от концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клеток. Автором получены новые данные, раскрывающие эффекты убаина на активацию отдельных MAP-киназ и на активацию сигнальных каскадов, в целом.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Теоретическая значимость работы обусловлена тем, что полученные диссертантом данные о механизмах нейротоксичности КТС позволят расширить представления о роли эндогенных КТС в патофизиологических процессах в ЦНС, об особенностях регуляции Na^+, K^+ -АТФазы в нейронах, причинах ее дисфункций и их значимости в процессах нейродегенерации. С практической точки зрения результаты работы могут внести вклад в развитие исследований, направленных на поиск подходов для минимизации нейротоксического воздействия КТС на ЦНС. В этом аспекте представляют интерес данные о минимальных нейротоксических концентрациях исследуемых КТС, значениях полученных констант ингибирования, показателях, отражающих эффекты на активацию MAP-киназ. Результаты исследования могут быть внедрены в учебный процесс в ВУЗах медико-биологической направленности в рамках лекционных курсов по биохимии, патологической физиологии, медицинской химии.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности

Диссертационная работа Лопачева А.В., изложенная на 253 страницах (129 страниц – вариант, написанный на русском языке, и 124 страницы – на английском) состоит из разделов Введение, Обзор литературы, Материалы и методы исследования, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы. Диссертация проиллюстрирована 48 рисунками; список процитированной литературы включает 340 источников, существенную долю составляют статьи, опубликованные в последние 5 лет. Диссертация логически выстроена, разделы работы дополняют друг друга.

Во введении автором обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи работы, раскрыты научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также представлены основные положения, выносимые на защиту, приведены сведения об апробации результатов работы.

В обзоре литературы, включающем четыре раздела, приведена общая характеристика Na^+, K^+ -АТФазы, рассмотрены механизмы действия кардиотонических стероидов как специфических ингибиторов Na^+, K^+ -АТФазы; обсуждены данные научных статей, описывающих эффекты КТС на функционирование клеток млекопитающих вне ЦНС; проанализированы имеющиеся в литературе представления о роли Na^+, K^+ -АТФазы и КТС в физиологических и патофизиологических процессах в ЦНС.

В главе «Материалы и методы исследования» подробно описаны использованные в работе методики. Глава содержит 11 разделов, где изложены различные биохимические методы, в том числе описана процедура получения фракции микросом из коры головного мозга крысы, методика измерения активности Na^+, K^+ -АТФазы во фракции микросом, определения констант ингибирования для чувствительной (изоформы α_2, α_3) и нечувствительной к убаину (изоформа α_1) фракций Na^+, K^+ -АТФазы, оценки уровня фосфорилирования и общего количества белков в лизатах первичной культуры нейронов крысы с использованием Вестерн-блоттинга. Изложены методы и подходы получения и ведения первичной культуры клеток коры головного мозга крысы и первичной культуры клеток мозжечка крысы; различные методы оценки жизнеспособности клеток после их обработки исследуемыми соединениями. Указаны избранные методы статистической обработки результатов.

Глава «Результаты исследований и их обсуждение» состоит из пяти разделов, в которых автор приводит данные, обосновывающие положения, выдвинутые на защиту, проводит их сопоставление с имеющимися в литературе сведениями. Получены показатели, характеризующие нейротоксический эффект КТС убаина, буфалина и дигоксина на клетки первичной культуры нейронов крысы, определены их минимальные токсические концентрации, получены значения констант ингибирования α_1 изоформы α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы микросомальной фракции, выделенной из больших полушарий мозга крысы, исследованы механизмы активации MAP-киназ КТС (убаином) в первичной культуре нейронов крысы. На примере убаина показано, что нейротоксичность КТС в концентрациях, на порядок и более превышающих его минимальную токсическую концентрацию, определяется продолжительной активацией ERK1/2. Доказано, что изменение концентрации Ca^{2+} внутри нейронов, и активация p38, наблюдаемая при воздействии КТС на первичную культуру нейронов мозга крысы, не связаны их с нейротоксическим эффектом. Автор делает предположение, что токсичность сердечных гликозидов зависит от продолжительности вызываемой конкретным КТС активации ERK1/2, а также может быть опосредована их эффектами на p38 и JNK. Диссертация хорошо иллюстрирована, содержит 48 рисунков. Полученные экспериментальные данные обработаны с помощью адекватных методов математической статистики, достоверность результатов не вызывает сомнений. В качестве замечания могу отметить, что на рисунках не указано n - количество значений в выборках. В главе «Заключение» обобщены основные положения диссертации, приведены наиболее значимые итоги работы. Выводы обоснованы и корректны, соответствуют поставленным задачам. На мой взгляд, они несколько перегружены деталями. Работа является завершенным научным исследованием и, в целом, производит благоприятное впечатление. В числе критических замечаний можно отнести наличие опечаток, в том числе в заключении и выводах, неудачных стилистических оборотов (привожу пример - фраза в разделе «Научная новизна работы»: «Было показано, что увеличение активации p38 и уменьшение активации JNK связано в нейронах при ингибировании $\alpha_2 + \alpha_3$ изоформ α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы убаином связаны с увеличением концентрации Ca^{2+}

внутри цитоплазмы, в то время как активация ERK1/2 – не связана» довольно сложна для восприятия). Указанные недочеты не влияют на положительную оценку диссертационной работы Лопачева А.В.

Таким образом, можно сделать заключение, что диссертация Лопачева А.В. является научно-квалификационной работой в области биохимии, в которой содержится решение научной задачи, связанной с расшифровкой механизмов нейротоксического действия экзогенных и эндогенных кардиотонических стероидов. В целом, полученные данные вносят вклад в развитие фундаментальных представлений о роли кардиотонических стероидов в патофизиологических процессах в ЦНС, а также могут быть использованы в медико-биологических исследованиях, направленных на поиск путей снижения токсических эффектов лекарственных средств, применяемых для коррекции нарушений функционирования сердечно-сосудистой системы.

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.

Председатель
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН
профессор кафедры биохимии
Биологического факультета СПбГУ



Шамова О.В.

15.12.2021 г.