

ОТЗЫВ

официального оппонента Ведуновой Марии Валерьевны на диссертационную работу Исакиной Марины Владимировны «Роль липидов в процессах проведения возбуждения и регенерации поврежденных соматических нервов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика

Актуальность темы

Диссертационное исследование Исакиной М.В. посвящено изучению роли липидов в процессах проведения возбуждения и регенерации поврежденных соматических нервов. В настоящее время данная тематика исследований является одним из приоритетных направлений в биофизике и нейробиологии, поскольку мембранные липиды и продукты липидного метаболизма принимают активное участие в регуляции активности фосфолипазы A_2 , протеинкиназы С, работе ионных каналов, в формировании гидрофобной зоны мембраны и определении ее фазового состояния, а также оказывают воздействие на другие регуляторные процессы организма (ионный гомеостаз, проведение гормонального сигнала, транскрипцию генов, синтез различных высокоактивных липидных биорегуляторов и функционирование большинства регуляторных белков).

Детальное изучение физико-химических свойств мембранных липидов позволит расширить современные представления о молекулярных механизмах возникновения и проведения возбуждения, а также о процессах, протекающих при травме нервного волокна.

Кроме того, в связи с неуклонным ростом числа случаев травм центральной нервной системы и недостаточной эффективностью различных подходов и методов их лечения, возникает острая необходимость разработки инновационных фармакотерапевтических стратегий, направленных на нивелирование развития патологических сценариев и стимуляции регенеративных процессов в посттравматическом периоде. Перспективным направлением в данной области исследований является использование

биологически активных веществ, направленных на восстановление физико-химических свойств клеточных мембран в частности, гиалуроновой кислоты.

Таким образом, важность проведения исследований, направленных на изучение механизмов, лежащих в основе проведения возбуждения по соматическим нервам и регенерации поврежденных нервных проводников, свидетельствует об актуальности диссертационного исследования Исакиной М.В.

Научная новизна работы

В работе получены новые сведения о липидной структуре мембран соматических нервов при проведении возбуждения и посттравматической регенерации. Автором впервые было показано положительное воздействие гиалуроната калия на способность к восстановлению физико-химического состояния бислоя и микровязкости липидного компонента соматических нервов. Кроме того, выполненная автором на высоком методическом уровне серия исследований позволила определить один из возможных молекулярных механизмов действия данного вещества, заключающийся в регуляции активности Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 в посттравматическом периоде.

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертационная работа Исакиной М.В. расширяет фундаментальные представления о роли мембранных липидов в функционировании центральной нервной системы, что, несомненно, вносит весомый вклад в развитие таких областей науки как биофизика, мембранология, физиология и нейробиология. В практическом отношении ценность полученных результатов определяется перспективностью разработки новых методов стимуляции, направленных на высокоэффективное восстановление морфофункциональной целостности соматических нервов, а также инновационных терапевтических стратегий для коррекции травм ЦНС различного генеза.

Достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации.

В диссертационном исследовании был использован достаточный объем экспериментального материала в сочетании с корректным применением современных методов и подходов, широко используемых в ведущих

нейробиологических лабораториях. Полученные экспериментальные данные подлежали корректному математическому и статистическому анализу. На основании полученных данных диссертантом сделаны обоснованные выводы. Детальное ознакомление с рукописью не позволило усомниться в достоверности представленных в работе результатов.

Структура диссертации и автореферата

Диссертационная работа Исакиной М.В. изложена на 168 страницах машинописного текста. Структура диссертации традиционная, включает следующие главы: Введение, Обзор литературы (глава 1), описание методов исследования (глава 2), результаты исследования и их обсуждение (главы 3,4,5), затем следует заключение, выводы и список литературы, включающий 225 источников, из которых 112 принадлежат зарубежным авторам. Работа содержит достаточное количество иллюстративного материала, наглядно описывающего дизайн диссертационного исследования (55 рисунков, 2 таблицы, а также 37 таблиц в Приложении).

Во **введении** обоснована актуальность проводимого диссертационного исследования, четко формулируются цель и задачи, приведена общая характеристика работы.

Обзор литературы выполнен на основе проведенного автором глубокого анализа широкого спектра отечественных и зарубежных публикаций по тематике диссертационного исследования. В данном разделе представлена подробная информация о составе липидов нервной ткани и биологической роли ферментов группы фосфолипазы A_2 в развитии дегенерационных и регенерационных процессов. Особое внимание автор уделяет вопросу о ныне существующих методах стимуляции восстановления нервной ткани и роли гиалуроновой кислоты в нейрорегенеративных процессах.

В целом, литературный обзор производит благоприятное впечатление, написан доступным научным языком, хорошо логически выверен, а представленная в нем информация убедительно доказывает читателю необходимость проведения исследований в выбранном направлении.

В главе 2 содержатся подробные сведения о **материалах и методах исследования**. В ней описаны методики регистрации потенциала действия, спектроскопии комбинационного рассеяния и дифференциальной сканирующей калориметрии. Приведены методики экстракции липидов, микротонкослойной хроматографии липидов, их идентификации и количественного определения, газовой хроматографии жирных кислот. Изложена методология спектрофотометрического метода определения содержания диеновых конъюгатов и малонового диальдегида. Приведены сведения об используемых автором статистических методах анализа полученных экспериментальных данных.

Результаты диссертационного исследования представлены в главах 3-5 и наглядно отражены иллюстративным материалом.

В главе 3 представлены результаты экспериментальных исследований по изучению фазового состояния и состава липидов при возбуждении, а также фазового состояния липидного бислоя, состава липидов и биоэлектрической активности проксимального и дистального отрезков нервного волокна при повреждении и действии гиалуроната калия. Автором установлено, что при возбуждении соматических нервов происходит интенсификация метаболизма фосфоинозитидов, процессов перекисного окисления липидов и активация фосфолипазы A_2 , коррелирующие с изменением физико-химического состояния липидного бислоя. Показано, что механическое повреждение нерва приводит к частичному сохранению проводимости только в его проксимальном отрезке к 30-м суткам наблюдения. Нарушение функциональной активности нервных волокон сопровождается существенными изменениями липидного состава и содержания продуктов перекисного окисления липидов как в проксимальном, так и в дистальном конце нерва. Полученные данные согласуются с результатами по изучению фазового состояния липидов, полученными с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии. Установлено, что гиалуронат калия способствует сокращению сроков восстановления функциональной активности, что выражается в увеличении

амплитуды потенциала действия и стабилизации липидного состава нервного волокна.

Результаты исследований, представленные в главе 4, свидетельствуют об изменении физико-химического состояния липидного бислоя при повреждении нервного волокна. Установлено, что применение гиалуроната калия способствует восстановлению микровязкости липидного компонента соматических нервов.

Экспериментальные исследования, описанные в главе 5, были направлены на определение влияния гиалуроната калия на активность фосфолипазы A_2 . На основе полученных результатов автором сделано предположение, что стимуляция регенерационных процессов в поврежденном нервном волокне при действии гиалуроната калия, опосредовано функционированием Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 .

Полученные результаты обсуждаются автором в свете современных представлений о липидном составе мембран нервных клеток и значимом участии ферментов группы фосфолипазы A_2 в активации регенеративных процессов в посттравматическом периоде.

Завершается диссертационная работа Заключением, где в лаконичной форме обобщены проведенные исследования и полученные результаты. Выводы диссертационного исследования логически вытекают из изложенных результатов, соответствуют поставленным в работе цели и задачам.

Освещение диссертации в научной печати.

Результаты диссертационного исследования Исакиной М.В. доложены на конференциях российского и международного значения, а также освещены в центральной печати в виде 18 работ, в числе которых 1 статья в российском научном журнале, рекомендованном ВАК РФ и 2 статьи в зарубежных журналах, индексируемых в базе данных Scopus.

Информация, представленная в автореферате, полностью отражает содержание теоретических и практических положений диссертации, выводы идентичны.

С учетом проведенного анализа диссертационного исследования Исакиной М.В., хотелось бы высказать свои пожелания и задать ряд уточняющих вопросов, не умаляющих достоинств работы, но важных для ее успешного продолжения:

Одним из ключевых вопросов данного исследования является вопрос о возможных механизмах действия гиалуроновой кислоты или ее солей на активность внутриклеточных ферментов, в частности фосфолипазы A_2 , а также на липидный состав мембран нервных клеток. Однако ни в проведенном обзоре литературы, ни в главе результаты исследований, данный ключевой механизм не раскрыт. Таким образом, представляет интерес на основании чего был выбран в качестве возможного терапевтического агента гиалуронат калия и каковы возможные механизмы влияния данного вещества на процессы регенерации, активность фосфолипазы и изменения липидного состава мембраны.

Автором показано, что гиалуронат калия оказывает активное влияние на все исследуемые показатели в условиях моделируемой травмы. Почему при проведении исследований не было изучено влияние гиалуроната калия на неповрежденный седалищный нерв? Возможно, что действие гиалуроната калия в физиологических условиях имеет принципиальное значение для понимания роли данного агента в изменении ключевых показателей липидного состава мембраны. Отсутствие группы ложнооперированных животных также вносит некоторую неопределенность в значимость полученных изменений.

Марина Владимировна делает в своей работе промежуточный вывод о том, что «введение гиалуроната калия в его максимальной концентрации приводит к стабилизации фосфолипидного и жирнокислотного состава, тем самым способствуя восстановлению свойств мембран поврежденных нервных волокон». Как восстановление свойств мембран связано с регенерацией нерва при перерезке? Говорит ли тот факт, что все наиболее значимые изменения наблюдаются на 3 сутки после травмы нерва о том, что после этого периода начинается спонтанная регенерация нерва?

В работе имеются некоторые неточности в формулировках выводов, например, в выводе 1 «В ходе проведенных нами экспериментов было установлено, что в липидном компоненте контрольных соматических нервов крысы содержатся ФЭА, ФХ, СМ, ФС, ФИ, ЛФХ, ЛФЭА и ДАГ...». Представленные данные не обладают научной новизной, так как липидный состав соматических нервов хорошо исследован и представлен в печати, в том числе сотрудниками кафедры, на базе которой выполнена работа. Возможно более уместна была бы формулировка о том, что впервые исследован столь широкий спектр липидов соматических нервов крысы.

Так же в главе 2. Объект и методы исследования имеется упоминание о третьей группе животных (ст. 46), у которых повреждение седалищного нерва осуществлялось путем наложения лигатуры. Однако в главе "Результаты" не приведены данные по изучению влияния перевязки на биохимические и биофизические показатели функционального состояния седалищного нерва. При этом, в подписях ко всем рисункам указана одна исследуемая группа «Повреждение», без уточнения к какой из экспериментальных групп относится данный график. Также возникает вопрос: были ли обнаружены различия в показателях при использовании различных травматических моделей? Если нет, то зачем были выбраны две экспериментальные модели?

В главе 2 так же не указан метод определения общих липидов. Однако огромное количество полученных данных были нормированы именно относительно данного показателя или группы показателей, так как имеются разночтения в подписях к рисункам. Например, рисунок 3.16 ст. 71 и рисунок 3.45 ст. 102 единицы измерения мкг/мг ОЛ (где ОЛ – общие липиды), рисунок 3.47 ст. 104 ммоль/мг липидов. В данных случаях липиды и общие липиды это одно и то же? Или липиды – это одна из интересующих фракций всего многообразия липидного состава седалищного нерва?

Следует подчеркнуть, что вышеуказанные замечания не снижают общей ценности диссертационной работы, а носят лишь рекомендательный характер.

Заключение

Принимая во внимание актуальность выполненной работы, ее научную новизну, обоснованность выводов, а также их существенную теоретическую и практическую значимость, можно заключить, что диссертационная работа Исакиной Марины Владимировны «Роль липидов в процессах проведения возбуждения и регенерации поврежденных соматических нервов», полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Официальный оппонент

Доктор биологических наук
старший научный сотрудник
кафедры нейротехнологий

Института биологии и биомедицины

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»

Ведунова Мария Валерьевна

адрес: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23

тел.: +7 (831) 462-32-02

e-mail: Mvedunova@yandex.ru

Подпись Ведуновой М.В. заверяю
Ученый секретарь НИГУ
им. Н.И.Лобачевского



Черноморская Лариса Юрьевна

20.05.2016г.