

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента о диссертации Пиняева С.И.

«Исследование состава и состояния липидов, белков и активности антиоксидантных ферментов при возбуждении и действии ресвератрола на регенерацию поврежденных соматических нервов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

### **Актуальность темы выполненной работы**

Диссертационная работа Пиняева Сергея Ивановича посвящена изучению механизмов, лежащих в основе проведения электрического импульса по соматическим нервам и регенерации поврежденных нервов. Возникновение, распространение и рецепция электрического сигнала является фундаментальным процессом, обеспечивающим быстрое регулирование и координацию функционирования органов и систем многоклеточных организмов. Все три фазы электрического сигнала в нервном волокне являются результатом быстрых и очень сложных взаимодействий между белками и липидами, основными компонентами биологических мембран нервных проводников, которые создают и регулируют трансмембранные ионные потоки. Изменения в химическом составе и конформационном состоянии липидов и белков нервных волокон приводят к изменению важнейших свойств мембраны, таких как микровязкость мембраны, температура фазовых переходов, и других свойств, определяющих работу ионных каналов и, соответственно, проведение сигнала по волокну.

При механической травме волокна, которую в эксперименте моделируют перерезкой нерва лабораторного животного, центральная регуляция сохраняется только в проксимальном конце нервного волокна. Исходя из этого факта, естественно ожидать, что изменения, возникающие в результате повреждения, должны различаться в проксимальном и дистальном концах нервного волокна. До настоящего времени, эти различия слабо исследованы, что ограничивает возможности поиска новых, более эффективных методов восстановления нервной ткани и функций поврежденных соматических нервов. Одним из перспективных направлений для стимуляции

посттравматической регенерации нервных волокон безусловно является использование природных биологически активных веществ. Автор диссертационного исследования обратился в этой связи к одному из природных полифенолов, привлекающему внимание широким спектром биологической активности. Несмотря на обширную литературу о разнообразных свойствах ресвератрола, практически неизвестно о его роли в регуляции процессов регенерации поврежденных соматических нервов. Поэтому диссертационная работа С.И. Пиняева безусловно интересна и её актуальность не вызывает сомнений.

#### Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, для науки и практики

Научная новизна диссертационной работы Сергея Ивановича заключается в том, что в ходе данного исследования им впервые проведен комплексный анализ по участию ряда белков и липидов в регенерации поврежденных периферических нервов и влияния на эти процессы биологически активного вещества ресвератрола. Полученные результаты имеют теоретическую и практическую ценность для понимания фундаментальных процессов, лежащих в основе функционирования нервных проводников при проведении по ним возбуждения. Анализ изменения состава основных компонентов нервных волокон позволяет глубже понять процессы, которые происходят при повреждении соматических нервов, особенно, в начальный период развития патологии. С.И. Пиняевым впервые показано, что использование природного полифенольного вещества ресвератрола способствует восстановлению отдельных фракций фосфолипидов и миелин-специфических белков в поврежденном периферическом нерве. Методами дифференциальной сканирующей калориметрии и спектроскопии комбинационного рассеяния показаны изменения физико-химического состояния бислоя липидов при проведении возбуждения и травме нерва. Ускорение процессов регенерации в

поврежденном нервном стволе при влиянии ресвератрола вероятнее всего опосредовано функционированием антиоксидантных ферментов.

### **Структура диссертации и автореферата**

Диссертационная работа Пиняева Сергея Ивановича «Исследование состава и состояния липидов, белков и активности антиоксидантных ферментов при возбуждении и действии ресвератрола на регенерацию поврежденных соматических нервов» изложена на 117 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка использованных источников (216 источников, из которых 185 принадлежит иностранным специалистам). Иллюстративный материал включает 50 рисунков и 2 таблицы. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертационной работы. Реферат хорошо иллюстрирован и написан достаточно ясным языком, несмотря на изобилие формул и терминов.

Во **Введении** обоснована актуальность исследования, формулируется цель и задачи работы, новизна и научно-практическая ценность полученных результатов. Представлены положения, выносимые на защиту.

В **Обзоре литературы** С.И. Пиняев основное внимание уделяет пространственной организации нервного волокна, липидному и белковому составу компонентов, формирующих волокно и его составные части. Описаны современные взгляды о механизме проведения возбуждения по нервам, их фосфолипидный и белковый состав миелина до травмы и после повреждения нервной системы. Довольно подробно описано функционирование периферической нервной системы в норме и при повреждении, в частности при окислительных процессах в липидном бислое. Вторая половина Обзора посвящена описанию процессов модуляции нейротрофических сигнальных путей природными полифенолами. Значительное внимание уделено основному объекту исследования, ресвератролу. Даётся его химическое строение и детальная характеристика теоретических основ его реакционной способности по отношению к эндогенным активным формам кислорода.

Представлен глубокий анализ взаимодействия с мембраной и рассмотрены перспективные способы стимуляции восстановления поврежденного нерва.

Глава **Материалы и Методы исследования** позволяет составить достаточно детальное впечатление о схемах и протоколах экспериментов, что дает возможность воспроизвести проводимые автором эксперименты. В работе были применены адекватные поставленным задачам современные методы исследования: экстракция липидов, микротонкослойная хроматография липидов, их идентификация и количественное определение, газовая хроматография жирных кислот, электрофоретическое разделение белков, спектрофотометрический метод определения содержания диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, активности ферментов и концентрации белка, метод регистрации потенциала действия, метод спектроскопии комбинационного рассеяния и дифференциальной сканирующей калориметрии. Статистическая обработка результатов убеждает в их достоверности и высоком научно-методическом уровне диссертационного исследования

**Результаты** представлены в главе 3 и наглядно иллюстрированы. К достоинствам оформления работы можно отнести то, что автор в **Заключении** предлагает наглядную схему, показывающую изменения, происходящие в соматическом нерве при возбуждении, механической травме и действии ресвератрола на фоне травмы.

Полученные в ходе исследования данные показывают, что ритмическое возбуждение миелинового нерва теплокровного сопровождается изменением содержания фосфоинозитидов и фосфатидилэтаноламина, а также изменениями фазового состояния липидного бислоя мембран миелина. Наблюдающиеся изменения не приводят к функциональным нарушениям и являются необходимыми для поддержания оптимального функционального состояния липидного бислоя мембранны и локализованных в ней ион-транспортирующих систем. Перерезка нерва приводит к перераспределению фосфолипидов и жирных кислот, интенсификации процессов перекисного

окисления липидов, снижение активности супероксиддисмутазы и увеличению каталазной и пероксидазной активностей. Изменение липидного состава при повреждении и продукты ПОЛ существенно изменяют температуру фазового состояния липидов, что свидетельствует о глубоких перестройках в липидном бислое соматических нервов, изменении ионного транспорта и активности многих мембраносвязанных ферментов.

Кроме липидного компонента наблюдаются изменения также и в белковой составляющей миелинового нерва. Травма нерва приводит к снижению, как общего количества белка, так и миелин-специфических белков. Это объясняется развитием валлеровской дегенерации. Введение ресвератрола усиливает регенерационные процессы в травмированном нерве, способствуя восстановлению содержания фосфолипидов и миелиновых белков, снижению уровня продуктов ПОЛ, увеличению активности супероксиддисмутазы и снижению активности каталазы и пероксидаз.

### **Освещение диссертации в научной печати**

Результаты диссертационного исследования Пиняева Сергея Ивановича доложены на российских и международных конференциях, а также освещены в центральной печати в виде 16 работ, в числе которых 1 публикация в российском научном журнале, рекомендованном ВАК РФ, 5 в рецензируемых журналах, входящих в международные базы Web of Science и Scopus.

**Выводы** диссертации соответствуют целям и задачам исследования, обоснованы фактическим материалом работы.

### **Замечания по диссертации**

1. В списке цитированной литературы 216 наименований, однако среди них только 29 (13%) относятся к периоду выполнения диссертационного исследования, если судить по дате публикации первых тезисов в 2014. В то же время 45 источников (21%) относятся к прошлому веку. Это может создать впечатление о недостаточной актуальности направления диссертационного исследования, что явно ошибочно, поскольку в базе данных PubMed ресвератрол упомянут более чем в 24 тысячах публикаций за последние 5 лет.

2. Раздел 1.2.2. автор начинает словами «Главная цель действия ресвератрола это клеточная мембрана». У молекулы не может быть цели и более корректным было бы утверждение, что основной мишенью ресвератрола является клеточная мембрана. Однако анализ литературы показывает, что это вещество способно взаимодействовать с множеством внутриклеточных белков, а также с мембранами эндоплазматического ретикулума, митохондрий и ядерной оболочки. По-видимому, недоучет этих обстоятельств вызвал крен цитируемой литературы в прошедший век.
3. В разделе Методы (стр. 50 автор) подчеркивает достоинства спектроскопии комбинационного рассеяния (КР- или Раман-спектроскопии) указывая, что «в отличие от других оптических методов спектры КР чувствительны даже к незначительным изменениям в структуре исследуемых веществ». С.И. Пиняев ссылается на Родионову Н.Н., 2010, не упоминая этой работы в списке отечественных публикаций. Специалисты в области других методов, например, флуоресцентной спектроскопии и микроскопии считут это утверждение спорным. На наш взгляд, большое, но не уникальное достоинство КР-спектроскопии (в варианте микроскопии тоже) это возможность изучения широкого набора биологических структур, в том числе, не имеющих хромофорных групп, непосредственно в водном окружении.
4. Некоторые выводы страдают излишней детализацией и напоминают описание результатов. Например, в первом достаточно было указать количество исследованных фракций фосфолипидов и соотношение в них насыщенных и ненасыщенных жирнокислотных цепей. Четвертый, пятый и седьмой выводы можно было бы сделать менее повествовательными, более лаконичными.

Считаю необходимым отметить, что перечисленные выше замечания носят чисто технический характер, являются скорее советами по улучшению, чем констатацией серьезных ошибок и не влияют на научную ценность диссертационной работы, имеющей практическое и фундаментально-научное значение. Полученные результаты могут быть использованы в курсах преподавания нейробиологии в Университетах, имеющих кафедры биологического и медицинского профиля.

## Заключение

На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что диссертация С.И. Пиняева «Исследование состава и состояния липидов,

белков и активности антиоксидантных ферментов при возбуждении и действии ресвератрола на регенерацию поврежденных соматических нервов» является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи по исследованию регенерационных процессов в поврежденном периферическом нерве и возможном влиянии на эти процессы с помощью биологически активного вещества ресвератрола. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 03.01.02 – Биофизика и полностью отвечает требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, а ее автор, Пиняев Сергей Иванович, достоин присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика (биологические науки).

Официальный оппонент

доктор биологических наук



Сурин Александр Михайлович

Заведующий лабораторией нейробиологии и основ развития мозга,  
Федерального государственного автономного учреждения  
«Национальный медицинский исследовательский Центр здоровья детей»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,

119991, Москва, Ломоносовский проспект, д.2, стр.1,  
Тел. (499)134-14-45, e-mail: surin\_am@mail.ru

Подпись Сурина А.М. удостоверяю:

Ученый секретарь ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России



к.м.н. А.Г. Тимофеева

«27» ноября 2020 г