

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН (ИБК РАН)

142290, г. Пушкино Московской обл., ул. Институтская, д.3
Телефон: (4967) 73-05-19. Факс: (4967) 33-05-09. E-mail: admin@icb.psn.ru.
<http://www.icb.psn.ru>

«Утверждаю»

Директор Института биофизики
клетки РАН
д.б.н. О.С. Моренков

« 9 » апреля 2021 г

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу диссертации Хайтина Андрея Михайловича на тему «Участие ионов кальция в выживании и смерти нейронов и глиальных клеток после аксотомии», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - "Биофизика".

Актуальность исследования.

Индукцированная клеточная гибель является естественным процессом в тканевом гомеостазе и сопровождается разнообразными патологическими процессами, включая травмы, инфаркты и инсульты. Исследование механизмов программируемой/индуцированной клеточной гибели по-прежнему остается в сфере интересов фундаментальных исследований, которые имеют несомненный прикладной потенциал как основа для разработки терапевтических подходов для управления клеточной гибелью. Актуальность рецензируемой работы обосновывается автором тем, что при травмах центральной и периферической нервных систем и при хирургическом вмешательстве происходит повреждение аксонов, что приводит к дегенерации нейрональной ткани как результат гибели нейронов и глиальных клеток. Есть основания думать, что клеточная гибель, индуцированная искусственной аксотомией в различных нерон-глиальных системах, в значительной степени воспроизводит естественные процессы, индуцированные травмами. Таким образом, использование аксотомии является

адекватный модельным подходом для исследования основополагающих механизмов индуцированной деградации нейрональных систем и поиска средств купирования этого патологического процесса. В рамках данной логики целесообразность проведенного исследования сомнений не вызывает.

В качестве модельной нейроглиальной системы в работе использовался абдоминальный рецептор растяжения рака, который является традиционной клеточной моделью для анализа нейрон-глиальных взаимодействий, проводившегося в лаборатории научного руководителя диссертанта. В качестве основной цели исследования обозначено изучение Ca^{2+} -зависимых сигнальных процессов, запускаемых аксотомией в нейронах и окружающих их глиальных клетках. В список ключевых задач входили исследование Ca^{2+} динамики в рецепторе растяжения рака при аксотомии, анализ роли Ca^{2+} , Ca^{2+} каналов и Ca^{2+} -зависимых сигнальных белков на изменение электрической активности механорецепторного нейрона, изучение феноменологии гибели сателлитных глиальных клеток вдали от места повреждения аксона. В рамках использовавшейся клеточной модели перечисленные цели и задачи можно считать вполне актуальными.

Научная новизна.

Разработана методика выделения механорецептора рака, обеспечивающая сохранение *ex vivo* связей механорецепторного нейрона с ганглием брюшной нервной цепочки. Изучены процессы, индуцированные аксотомией в данной нейрон-глиальной системе. Показано, что аксотомия инициирует повышение Ca^{2+} в удаленных глиальных клетках и стимулирует их гибель по механизму некроза или апоптоза при участии ряда систем Ca^{2+} гомеостаза и Ca^{2+} -регулируемых белков. Исследование в целом вносят достаточный вклад в детализацию процесса клеточной гибели в исследовавшейся нейрон-глиальной системе и основополагающих механизмов.

Научная ценность и требуемая степень новизны полученных результатов достаточны для классификационной работы.

Адекватность методов и достоверность полученных результатов.

Результаты, представленные в работе, во многом были получены благодаря адекватной методологии, которая опиралась на необходимую и достаточную совокупность методов физиологии клетки и микроскопии. В частности, мониторинг электрической активности механочувствительного нерона осуществлялся методами экстраклеточной

регистрации электрических потенциалов с использованием компьютерной системы сбора и обработки информации. Флуоресцентная микроскопия и Ca^{2+} зонд Fluo-4 использовались для мониторинга динамики внутриклеточного Ca^{2+} в нейрональных и глиальных клетках. Ингибиторный анализ привлекался для оценки роли различных транспортных и регуляторных белков в процессе индуцированной клеточной гибели. Апоптотические и некротические клетки идентифицировались с использованием специфических красителей.

Применявшиеся методы и подходы в целом изложены в достаточных подробностях, что позволяет получить ясное представление о том, как и с какой целью проводились конкретные эксперименты. Полученные данные адекватно представлены в приведенных рисунках, достаточной иллюстративности и графического качества. Достоверность полученных результатов основана на многократном воспроизведении экспериментов в сочетании с адекватной статистической обработкой полученных данных.

Отмечу также, что основные результаты диссертации обсуждались на представительных международных и отечественных конференциях и опубликованы в рецензируемых журналах, включая такие авторитетные международные журналы, как *Molecular and Cellular Neuroscience* и *Glia*. В целом, основные положения работы прошли достаточно жесткий экспертный анализ.

Теоретическая значимость работы и основные результаты.

Теоретическая часть работы преимущественно представлена в форме обзора литературы. Хотя в свете имеющихся публикаций его нельзя назвать исчерпывающим, в нем в необходимой и достаточной степени представлены сведения о видах аксотомии, о функциональных последствиях данного повреждения на системном и клеточном уровнях и о молекулярных механизмах, вовлеченных в реакцию клеток. В свете проблематики исследования, достаточно большое внимание уделено механизмам клеточной гибели, их идентификации и классификации. Обзор, несомненно, может использоваться как справочный материал в аналогичных исследованиях.

В работе были получены следующие ключевые результаты:

1. В исследованной клеточной модели аксотомия инициировала функциональную инактивацию нейронов и гибель сателлитной глии, удаленной от места повреждения. Механизмы гибели были идентифицированы как некроз и апоптоз.

2. Показано, что системы Ca^{2+} гомеостаза и некоторые Ca^{2+} -зависимые процессы могут играть существенную роль в клеточной гибели, инициированной аксотомией, повреждающее действие которой в значительной степени ассоциируется с повышением внутриклеточного Ca^{2+} в нейроне и сателлитной глие.

3. Показано, что, как и в других нейроглиальных системах, в клеточной системе рецептора растяжения митохондрии и ряд Ca^{2+} -регулируемых белков вовлечены в процессы клеточной гибели. Данные ингибиторного анализа, в частности, указывали на участие протеинкиназы C, Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую киназу и Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов в регуляции процессов гибели глии, включая их участие в выборе пути клеточной смерти по механизму некрозом или апоптоза.

Замечания по диссертационной работе.

Хотя в научном и стилистическом отношении диссертационная работа Хайтина А.М. оставляет в целом хорошее впечатление, напрашиваются следующие замечания.

1. Хотя многочисленные примеры свидетельствуют о значительной универсальности молекулярных механизмов, лежащих в основе физиологических процессов в клетках различных организмов от дрозофилы до человека, столь же множественные примеры говорят о том, что сходство не означает идентичность. Достаточно сказать, что гомологичные гены в разных организмах могут кодировать белки с разными физиологическими функциями. В свете сказанного, и учитывая прикладной аспект, приданный работе во введении и при изложении ее научно-практической значимости, требуется обоснование, более убедительное чем в диссертации, что абдоминальный рецептор растяжения рака является адекватной моделью для анализа процессов, ассоциирующихся с повреждением и регенерацией нейрональных систем человека или хотя бы грызунов.

2. Большинство положений диссертации базируется на данных ингибиторного анализа. При всех достоинствах этого подхода, используемые в исследовательской практике антагонисты, ингибиторы, блокаторы и модуляторы оказывают физиологические эффекты, за редким исключением воздействуя на множественные клеточные мишени. Интерпретация данных в соответствующей части диссертационной

работы проводилась без тени сомнения, для которого, между тем, есть определенные основания. Так, мауротоксин, использовавшийся в работе в качестве ингибитора Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов, также ингибирует потенциал-зависимые K^+ каналы нескольких типов. Неясно, почему не использовались существенно более специфичные соединения типа апамина. Замечу также, что циклоспорин А не только ингибитор митохондриальной поры МРТР, но и Ca^{2+} -зависимой фосфатазы кальцинейрина и некоторых киназ. В качестве ингибитора кальмодулина указывается флуфеназин, который является антагонистом дофаминовых рецепторов и некоторых серотониновых и адренэргических рецепторов. Выбор клеточных мишеней недостаточно хорошо обоснован в контексте механизмов клеточной гибели.

Заключение

Материалы, представленные в диссертации Хайтина А.М., не оставляют сомнения в целесообразности исследования, предпринятого соискателем. Результаты рецензируемой работы расширяют существующие представления о механизмах, которые могут детерминировать клеточную гибель, индуцированную аксотомией в абдоминальном рецепторе растяжения рака и, возможно, в других нейрон-глиальных системах. Высказанные замечания не снижают высокой оценки рецензируемой диссертационной работы, которую можно квалифицировать как законченное исследование, содержащее весомые научные данные. Выводы работы обоснованы и адекватны полученным результатам. Автореферат в достаточной степени отражает содержание диссертации.

Важно также отметить, что материалы диссертации Хайтина А.М. могут быть использованы при исследовании на клеточном уровне патологических и регенерационных процессов, протекающих в нейрональных системах при повреждении аксонов. Среди учреждений соответствующего профиля следует отметить Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава РФ, Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАН. Материалы диссертации могут представлять самостоятельную ценность для использования в учебном процессе в ВУЗах биологического и медицинского профиля.

Изложенное выше в целом дает основание считать, что по своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости рецензируемая диссертационная работа полностью соответствует всем требованиям («Положение о

порядке присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842 в действующей редакции от 01 октября 2018 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Хайтин Андрей Михайлович, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - "Биофизика".

Отзыв обсужден и одобрен на совместном семинаре лабораторий Молекулярной физиологии клетки и Внутриклеточной сигнализации Института биофизики клетки РАН 8 апреля 2021 года (протокол №1).

Секретарь заседания

к.б.н. Рогачевская О.А.

Отзыв подготовил

Станислав Сергеевич Колесников
Заведующий лабораторией
Молекулярной физиологии клетки ИБК РАН
142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, д.3
д.б.н., профессор
Email: staskolesnikov@yahoo.com
Тел.: 8-(4967)-739121

«Подписи заверяю»
Ученый секретарь ИБК РАН
к.б.н. Шавкунов К.С.

