

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

На диссертационную работу

Помыткина Игоря Анатольевича «Механизм регуляции чувствительности
инсулинового рецептора в нейронах»

на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4.
Биохимия.

Работа И.А. Помыткина – это результат исследований, проведённых автором на протяжении более 20 лет – основательный и актуальный труд.

Отмечу то, что, на мой взгляд, самое важное в диссертационной работе, и в чём состоит её **научная новизна**. До представленной к защите работы было известно о существовании системы окислительной регуляции активности инсулинового рецептора (ИР), которая действует через НАДФН-оксидазу, однако было известно, что эта система есть в адипоцитах - клетках жировой ткани. Автор открыл существование в нейронах мозга (а также клетках сердца и печени) системы окислительной регуляции ИР, которая отличается тем, что вместо НАДФН-оксидазы в ней задействована сукцинатдегидрогеназа (СДГ) митохондрий, причём обратная связь (от ИР к СДГ) осуществляется посредством G-белка. Расшифровав механизм действия этой регуляторной системы, автор разработал, синтезировал и опробовал в экспериментах и в клинике принципиально новое средство, повышающее чувствительность нейронных ИР к инсулину – дихолинсукцинат – и показал его эффективность в борьбе с инсулиновой резистентностью нейронных ИР. В этом заключается **актуальность**, современность и **практическая значимость** настоящей работы, что подтверждается высоким научным интересом к полученным автором результатам – солидным списком публикаций в высокорейтинговых журналах, а также 13 патентами автора.

Знакомство с содержанием работы позволяет утверждать, что **цель работы** – в том виде, в каком ее сформулировал автор – **достигнута**: молекулярные механизмы регуляции чувствительности ИР в нейронах подробно изучены, и на этой основе создан и апробирован новый подход к лечению инсулиновой резистентности, причем в фокусе внимания именно резистентность нейронов.

Выводы работы полностью обоснованы и соответствуют поставленным задачам.

Арсенал **методов**, примененных в исследовании, богат и разнообразен, **методы** современные, описаны достаточно полно для воспроизведения экспериментов, а в разделе

Результаты приводится описание, достаточно полное для того, чтобы **заключить, что** эксперименты выполнены тщательно и на высоком научно-техническом уровне.

Позвольте раскрыть некоторые моменты работы более подробно. При чтении описания **результатов научную новизну** работы можно проследить сразу по нескольким направлениям. Автор подробно изучил ранее неизвестную роль митохондрий в генерации окислительного сигнала инсулина и в регуляции активности протеинтирозинфосфатазы (ПТФ) – негативного регулятора активности ИР. Действительно, ещё до работы автора было известно, что *в адипоцитах* НАДФН-оксидаза (Nox) является инсулин-чувствительным источником H_2O_2 , ингибирующим ПТФ (негативные регуляторы активности ИР), но было неясно, общий ли это для всех тканей механизм. Автор работы впервые *выяснил и доказал роль митохондрий* в генерации H_2O_2 , служащей ключевым регулятором активности ПТФ, поставив прямые опыты на митохондриях *печени и сердца крысы* и показал возрастание более чем на порядок скорости генерации H_2O_2 и снижение более чем втрое активности ПТФ под действием добавки инсулина. Добавив ингибитор СДГ – малонат – автор наблюдал снижение силы эффекта инсулина на скорость генерации H_2O_2 и активность ПТФ. Добавив каталазу, автор наблюдал полную блокировку ингибирующего эффекта сукцината на активность ПТФ, из чего сделал однозначный вывод о том, что эффект опосредован H_2O_2 , и что окислительный сигнал инсулина существует не только в жировой ткани, но и в *печени и сердечной ткани*, причём не только НАДФН-оксидаза, но *митохондрии* являются источником окислительного сигнала инсулина. Добавив коклюшный токсин (pertussis toxin) – ингибитор G-белков (посредников, осуществляющих обратную связь между ИР и Nox), автор наблюдал снижение образования H_2O_2 и торможение фосфорилирования в ответ на инсулин, из чего сделал вывод об участии G-белков в механизме окислительной регуляции активности ИР.

В отдельной главе (Глава 4 Диссертации) автор дает ответ на вопрос, существует ли окислительный сигнал инсулина в мозге (*нейронах*), и подобен ли он тому, который автор наблюдал в печени и сердце (с участием СДГ митохондрий). Серия тщательно продуманных экспериментов позволила сделать однозначный вывод: да, митохондриальный комплекс II (СДГ) участвует в активации ИР *в нейронах*. Таким образом, впервые автором показано существование неизвестного ранее сигнального пути активации ИР *в нейронах*, при котором объект регуляции – это ИР (его фосфорилирование и активация), регулятором служит окислительный сигнал инсулина, а источником окислительного сигнала – СДГ. И при этом важно, что фосфорилированием ИР, как

оказалось, можно управлять не только изменением концентрации инсулина, но и изменением концентрации сукцината – субстрата СДГ.

Кроме того, весом вклад автора в исследование роли глутаматной эксайтотоксичности (ключевого повреждающего фактора при ишемии мозга) в развитии *инсулиновой резистентности* в нейронах.

Автор подробно исследовал механизм развития *инсулиновой резистентности*, изучив концентрационные зависимости и кинетику биохимических процессов, и показал, что фосфорилирование ИР сверхчувствительно к окислительному сигналу инсулина, то есть существует пороговое значение концентрации H_2O_2 , которое регулирует чувствительность ИР к инсулину по принципу "всё или ничего". В норме при превышении порогового значения концентрации H_2O_2 происходит фосфорилирование ИР по тирозинам с активацией рецепторной киназы, индуцируется передача сигнала ИР и развивается биологическая реакция. При недостижении порогового значения концентрации H_2O_2 ИР гипофосфорилирован (под действием ПТФ), и снижение его чувствительности приводит к *резистентности*. Выявленный автором механизм регуляции ИР – сигнальный окислительный путь – дополняет существовавшие представления о роли окислительной сигнализации в регуляции фосфорилирования ИР и расширяет их на новый тип клеток - нейроны.

Важным является открытие вовлечённости митохондриальной СДГ - комплекса II дыхательной цепи митохондрии – в производство инсулин-индуцированного сигнала H_2O_2 (при этом источником H_2O_2 является флавиновый сайт СДГ, комплекса II, ингибируемый малонатом).

Рассмотрев возможные причины гипофосфорилирования ИР в нейронах, автор приводит ясную схему на рис.24, где выделены негативные и позитивные факторы, влияющие на активность СДГ, и, в конечном счете, на генерацию окислительного сигнала инсулина и инсулин-зависимую передачу сигнала. Негативные факторы – это окислительный стресс, низкое отношение концентраций АТФ/АДФ, $CoQH_2/CoQ$, деполяризация митохондрий и утечка H^+ сквозь митохондриальную мембрану, а позитивные – наоборот, высокое отношение концентраций АТФ/АДФ, $CoQH_2/CoQ$. Рассмотрев концентрационные соотношения H_2O_2 и эндогенных антиоксидантов, автор выделяет пероксиредоксины и глутатионпероксидазу в качестве возможных барьеров развития окислительного сигнала инсулина. В экспериментах автора N-ацетилцистеин (НАС) способствовал удалению H_2O_2 , будучи субстратом глутатионпероксидазы, причём повышение активности этого фермента может привести к *инсулиновой резистентности*.

Автор связывает повышенную активность глутатионпероксидазы и концентраций перкисредоксинов в мозге при болезни Альцгеймера (БА) (как вероятные компенсаторные реакции на окислительный стресс) с гипофосфорилированием ИР. То есть обнаруженный и **впервые** изученный автором окислительный сигнал инсулина в нейронах позволяет логически связать патогенетические события в мозге при БА.

Также развитие инсулиновой резистентности в нейронах рассмотрено автором в условиях глутаматной эксайтотоксичности при другой патологии мозга – в острейший период *ишемического инсульта*. Автором детально рассмотрен механизм глутаматной эксайтотоксичности, проведены эксперименты по изучению динамики концентрации Ca^{2+} и трансмембранного потенциала в нейронах коры мозга крысы.

Прямым следствием открытия автора явился инновационный авторский подход к борьбе с инсулиновой резистентностью – применение дихолинсукцината, воздействующего именно на СДГ, для повышения чувствительности ИР к инсулину.

Автор глубоко, детально и всесторонне изучил и осветил медицинскую проблему инсулиновой резистентности в мозге, исключительно тщательно описал клинические этапы развития инсульта мозга и обосновал рациональный *момент воздействия* веществами, повышающими чувствительность ИР к инсулину и, таким образом, останавливающими развитие инсулиновой резистентности в мозге. Помимо инсульта, автор рассматривает подходы к борьбе с инсулиновой резистентностью при нейродегенеративном заболевании – БА.

Очень подробно и обстоятельно описаны: функции инсулина, как *нейромодулятора* в мозге; структура и молекулярный механизм работы тирозинкиназы в ИР; история выработки концепции инсулиновой резистентности как нарушения любого биологического ответа на экзо- или эндогенный инсулин; механизмы глутаматной токсичности; 20 выводов, резюмирующих **исчерпывающий обзор литературы**, который охватил все возможные аспекты сигнальной роли инсулина в мозге и развития инсулиновой резистентности – всё это – несомненные плюсы работы.

Из замечаний (несущественных **недочётов и вопросов к автору**) перечислю следующее. Известны сукцинатные рецепторы, регулирующие тканевый гомеостаз и играющие роль в реализации функций иммунной системы и развитии воспаления. Может ли разрабатываемый автором препарат дихолинсукцинат взаимодействовать с этими рецепторами? Рассматривалась ли такая возможность автором? В обзоре литературы в таблице на стр.19 не очень хорошо сочетаются *структуры* мозга крысы и *клетки* мозга человека, причем клетки лишь глиальные – астроциты, тогда как далее роль глиальных ИР

нигде не обсуждается. Действительно, из всех разнообразных клеток мозга автор фокусируется только на ИР *нейронов* и лишь в обзоре литературы упомянут глиальный ИР (на стр.19-20, при цитировании источника литературы): "в клетках глии экспрессируются ИР-А, и ИР-В, хотя плотность их существенно ниже, чем в нейронах". Но, может быть, ИР в глиальных клетках тоже выполняют важные функции, и хотелось бы, чтобы глиальным ИР было уделено чуть больше внимания. На стр.93 в выводах по Главе 3 написано, что митохондрии являются участником инсулиновой сигнализации в сердце, печени и *нейронах*, но до этого момента в Главе 3 ведь речь шла лишь о митохондриях *сердца и печени*, а о мозге и *нейронах* речь пойдёт в Главе 4 - далее. На стр.113 "с увеличением концентрации инсулина" слова нужно поменять местами. На стр.114 приведено сокращение инсулинового рецептора IR, тогда как ранее и в других местах ИР, а также некоторые рисунки не русифицированы (например, рис.3 в Автореферате). На стр.115 пропущены ссылки на цитируемую литературу (пустые скобки). Раствор Хенкса написан через "э". Автор называет нервные окончания "нервными терминалами" (например, стр.15 и 66), а дендритные шипики - "шипами" (на стр.56), но в морфологии/неврологии устоявшиеся термины - "терминали" и "шипики".

Высказанные **замечания** являются скорее вопросами-пожеланиями автору, не снижают ценности работы и **не меняют исключительно положительного впечатления от диссертационной работы** в целом.

Докторская диссертация Помыткина Игоря Анатольевича «Механизм регуляции чувствительности инсулинового рецептора в нейронах», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение проблемы, имеющей существенное значение для биохимии, а именно, открыто существование в мозге (а также в клетках сердца и печени) системы окислительной регуляции ИР, характеризующейся тем, что в ней задействована сукцинатдегидрогеназа (СДГ) комплекс II митохондрий, причём обратная связь (от ИР к СДГ) осуществляется посредством G-белка. Расшифровав механизм действия этой регуляторной системы, автор синтезировал и опробовал в экспериментах и в клинике принципиально новый "сенситайзер" ИР (дихолинсукцинат) – средство, повышающее чувствительность нейронных ИР к инсулину, и показал его эффективность на практике в борьбе с инсулиновой резистентностью нейронных ИР.

Научный консультант работы - д.м.н. профессор Владислав Николаевич Каркищенко. Результаты работы соответствуют паспортам специальности 1.5.4 – «Биохимия» (биологические науки) по областям исследования: 1. Проблемы строения,

свойств и функционирования отдельных молекул и надмолекулярных комплексов в биологических объектах, изучение молекулярной организации структурных компонентов, выяснение путей метаболизма и их взаимосвязей; 5. Анализ и синтез биологически активных веществ, выяснение их физиологического действия и возможностей применения полученных веществ в медицине и других отраслях народного хозяйства; 10. Теоретические и прикладные проблемы природы и закономерностей химических превращений в живых организмах, молекулярных механизмов интеграции клеточного метаболизма, связей биохимических процессов с деятельностью органов и тканей, с жизнедеятельностью организма для решения задач сохранения здоровья человека, животных и растений, выяснения причин различных болезней и изыскания путей их эффективного лечения. Развитие методов генодиагностики, энзимодиагностики и научных принципов генотерапии и энзимотерапии.

Считаю, что по актуальности, новизне, методическому уровню и практической значимости результатов, объему проведенных исследований диссертационная работа **«Механизм регуляции чувствительности инсулинового рецептора в нейронах»** полностью соответствует требованиям, установленным пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями от 26.10.2023 г. № 1786), а ее автор, **Помыткин Игорь Анатольевич**, безусловно заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – «Биохимия».

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологически активных наноструктур Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи) Министерства здравоохранения Российской Федерации

Бокша Ирина Сергеевна



e-mail: boksha_irina@mail.ru

<https://gamaleya.org>

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18

Тел.: +7 (499) 193-30-01; +7(915) 408-33-79

10. сентября 2024