

В Диссертационный совет
Д 212.038.03
при Воронежском
государственном
университете

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Ковалевой В.Д.
*«ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ NO-ЗАВИСИМЫХ СИГНАЛЬНЫХ
МЕХАНИЗМОВ В УСТОЙЧИВОСТИ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК
К ФОТОДИНАМИЧЕСКОМУ ПОВРЕЖДЕНИЮ»*, представленную на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.02 – биофизика

Актуальность темы

Актуальность диссертационной работы Ковалевой Веры Дмитриевны обусловлена чрезвычайным разнообразием внутри- и межклеточных процессов, регулируемых с участием оксида азота (NO). Эта молекула способна диффундировать в межклеточном пространстве, как типичный первичный мессенджер, и, в то же время, регулирует внутриклеточные процессы как классический вторичным мессенджером. Более того, NO активно участвует в окислительном стрессе, объединяясь с супероксиданион радикалом в пероксинитрит – мощный внутриклеточный окислитель. Процессы внутриклеточного окисления являются ключевыми при индукции повреждения при фотодинамическом воздействии (ФД) на ткани и лежат в основе фотодинамической терапии (ФДТ). Это метод широко используют, как в медико-биологических исследованиях, так и в медицинской практике, в частности, в онкологии для разрушения опухолей. Однако погибать могут не только злокачественные клетки, но также нейроны и глиальные клетки, в мозге или ткани, подвергнутой ФДТ. В этой связи очевидна необходимость детального исследования механизмов чувствительности нейронов и глиальных клеток к ФД-повреждению. Краткое перечисление событий, в которых активно участвует NO, позволяет представить многообразие процессов, запускаемых при ФДТ, и делает очевидной актуальность углубленного изучения динамики генерации NO при ФД-воздействии. Исходя из этого, В.Д. Ковалевой было проведено исследование динамики активации NO-синтазы и образования NO в темновых условиях и при ФД-воздействии на нейроны и глиальные клетки.

Необходимо подчеркнуть, что бифизические, биохимические и физиологические основы внутриклеточных механизмов, повреждаемых при окислительном стрессе, представляют одну из наиболее активно изучаемых проблем физиологии и медицины. Изучение этих механизмов чрезвычайно важно как для фундаментальной науки, так и для нужд клинической медицины, для создания лекарственных средств протекторного действия. Таким образом, поставленная автором цель работы – исследовать роль NO и различных изоформ NO-синтаз в устойчивости нейронов и глиальных клеток к фотодинамическому повреждению на примере рецептора растяжения рака, является, несомненно, актуальной.

Научная новизна исследования, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Автору впервые удалось оценить влияния NO на нейронную активность и гибель нейронов и глиальных клеток рецептора растяжения речного рака в темновых условиях и при ФД-воздействии.

Автором впервые проведено всестороннее комплексное исследование участия оксида азота и изоформ NO-синтаз в устойчивости нейронов и глиальных клеток рецептора растяжения рака к фотодинамическому повреждению, а также несколькими методами оценена локализация изоформ NO-синтазы в рецепторе растяжения рака и изучена динамика активации NO-синтазы и генерации NO при фотодинамическом воздействии, что является несомненным достоинством работы. Ковалевой В.Д. показано, что нейроглиальные взаимодействия, опосредованные NO, играют решающую роль в реализации процессов фотоиндуцированного повреждения, при этом, процессы ФД индуцированных повреждений по-разному реализуются в нейронах и глиальных клетках. Автором была также показано, что NO играет более значимую роль в ФД-индуцированном повреждении глиальных клеток, чем нейронов, в частности, продемонстрировано, что при ФД-воздействии NO участвует в реализации апоптоза клеток глии, и в то же время приводит к некрозу этих клеток. В работе впервые исследована роль нейрональной и индуцибельной NO-синтаз в повреждении нейронов и глиальных клеток при ФД-воздействии, а также уточнен вклад различных участников сигнального пути Оксид азота → растворимая гуанилатциклаза (sGC) → циклический гуанозинмонофосфат (сGMP) → протеинкиназа G (PKG) в процессах ФД-индуцированного повреждения нейронов и глии.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

Теоретическая значимость проведенного исследования состоит в том, что выяснение механизмов устойчивости нервной ткани к окислительному стрессу, вызванному ФД-воздействием, позволяет найти оптимальные пути решения ряда фундаментальных и прикладных биологических и медицинских проблем. Полученные диссертантом данные и литературные данные были обобщены и объединены в гипотетическую схему NO-зависимых сигнальных механизмов в нейронах и глиальных клетках речного рака, активируемых фотодинамическим воздействием.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в расширении и углублении представлений о роли NO и изоформ NO-синтазы в развитии некроза и апоптоза при ФДТ, открывающем перспективы для дальнейшей оптимизации этого метода с целью защиты здоровых нервных клеток. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о наличии потенциальной возможности модулировать тип клеточной смерти при ФДТ, воздействуя на разные изоформы NO-синтаз.

В исследованиях внутриклеточной сигнализации ключевым является выбор биологической модели. Вера Дмитриевна использовала рецептор растяжения речного рака, морфологические характеристики которого позволяют достаточно детально изучить функциональные свойства, как нейронов, так и глиальных клеток. Благодаря удачному выбору биологической модели, результаты проведенных исследований могут быть использованы при чтении лекционных курсов по общим и специальным дисциплинам, а также при проведении практических занятий, выполнении курсовых и выпускных квалификационных работ, магистерских диссертаций на биологических факультетах Университетов, в том числе, Воронежского государственного университета и Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета.

Достоверность и новизна научных положений и выводов диссертации обусловлена четкой логикой её построения, обоснованностью предлагаемых положений и выводов, надежной статистической обработкой данных.

Структура и объем диссертации.

Структура диссертации В.Д. Ковалевой стандартна для работ подобного рода. Работа написана на 130 страницах текста. В диссертации представлены: Введение, Литературный обзор, глава, содержащая описание объекта и методов исследования, главы 3-4, содержащие полученные результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы, список литературы (186 источников). Иллюстративный материал включает 4 таблицы и 37 рисунков.

В диссертационной работе представлен обстоятельный литературный обзор, в котором обобщаются данные о NO-зависимых сигнальных механизмах в нейронах и глии, характеризуются изоформы NO-синтаз и их локализация в нервных клетках. В обзоре широко освещены современные представления о ФД индуцированной гибели клеток и о роли NO в развитии апоптоза и некроза при ФД-воздействии. Обзор литературы включает данные большого числа литературных источников, преимущественно зарубежных.

Экспериментальная часть работы выполнена на современном научно-методическом уровне с применением широкого арсенала электрофизиологических, иммуногистохимических, биохимических, флуоресцентно-микроскопических методов. Используемые автором методики не только разнообразны, но очень информативны и адекватны поставленным задачам. Выживаемости нейронов и глии после ФД-воздействия исследовали посредством ингибиторно-активаторного анализа, с использованием 9 различных модуляторов NO-зависимых сигнальных процессов. Соотношение нейрональных и глиальных клеток в фазе некроза или апоптоз определяли посредством двойного окрашивания препаратов МРН флуоресцентными ядерными зондами пропидиум йодидом и Hoechst-33342. Активность NO-синтазы после ФД-воздействия и локализация фермента исследовали измеряя NADPH-зависимую реакцию восстановления солей тетразолия. Оценка локализации изоформ NO-синтазы проводилась методом непрямой иммунофлуоресценции. Для определения продукция оксида азота как в темновых условиях, так и при ФД-воздействии использовался специфичный флуоресцентный зонд на оксид азота, DAF-2DA. Стоит особо отметить, что все методы подробно описаны в главе 2 и могут быть легко воспроизведены. Результаты экспериментальной работы подвергались статистической обработке с использованием одномерного однофакторного дисперсионного анализа.

В главе 3 приведены данные о влиянии NO на нейроны, как в темновых условиях, так и при ФД-воздействии. Дополнительно к нейронам, Вера Дмитриевна исследовала роль NO в повреждении глиальных клеток в аналогичных условиях. Кроме того, предоставлены данные о продукции NO в рецепторе растяжения рака при ФД-воздействии и локализации NO-синтазы, а также динамике её активности при ФД-воздействии. Согласно полученным диссертантом результатам, NO-зависимые сигнальные процессы различаются в нейронах и глии рецептора растяжения рака. При ФД-воздействии NO образуется в нейроне, а затем, очевидно, в результате диффузии влияет на глиальные клетки, вызывая их апоптоз и снижая некроз.

В главе 4 обсуждаются данные о динамике активности NO-синтазы при ФД-воздействии, о продукции NO при ФД-воздействии, а также об особенностях локализации изоформ NO-синтаз, nNOS и iNOS, в рецепторе растяжения рака. Кроме того, обсуждаются данные о роли NO в повреждении нейронов и глии, как в темновых условиях, так и при ФД-воздействии. В этой главе также обсуждается роль сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG в повреждении нейронов и глиальных клеток при фотодинамическом воздействии.

В заключении диссертант приводит очень наглядную схему, иллюстрирующую участие указанного выше NO-зависимого сигнального механизма в повреждении нейронов и глиальных клеток рецептора растяжения рака при ФД-воздействии.

Материалы, представленные в этих главах, по объему и разносторонности выполненной работы, безусловно, сопоставимы с мировыми исследованиями подобных объектов с морфологически четко выраженными нейро-глиальными взаимодействиями. Полученные в данной работе результаты, их анализ и сопоставление с известными литературными данными интересны с позиции обобщения и систематизации представлений о роли NO-зависимых сигнальных механизмов в процессах повреждения нервных и глиальных клеток при окислительном стрессе.

Основные положения диссертационной работы представлены в 32 публикациях, 9 из которых в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Автореферат и опубликованные по теме диссертации научные работы соответствуют содержанию диссертации.

Работа не лишена, однако и некоторых недостатков:

1. Имеются некоторые поправки в оформлении. Например, на Рис. 1 в Обзоре литературы не расшифрованы обозначения Гл, Н, А и можно лишь догадываться, что речь идет о нейромедиаторе глутамате и его ионотропных рецепторах.
2. Дихотомия некроз-апоптоз уже утратила прежнюю четкую границу деления, хотя методически, основные морфологические признаки этих путей гибели, использованные в работе В.Д.Ковалевой, не подвергнуты радикальному пересмотру. Тем не менее, глава Обзор литературы выиграла бы, если бы автор упомянула, что выделяют не только несколько форм апоптоза, но и некроз стали рассматривать, как генетически зависимый процесс, по крайней мере, в некоторых случаях (см., например, Feoktistova, Leverkus. FEBS J. 2015; 282(1):19-31. Programmed necrosis and necroptosis signalling.)


3. В названиях осей и подписях к Рис. 1 автореферата, а также на Рис. 12 и 13 диссертации «время жизни нейронов» и «продолжительность импульсной активности» употребляются как синонимы, хотя это не является очевидным и нигде в тексте идентичность этих понятий автор не доказывает. Это же относится и заголовку таблицы 1 и комментариям к ней (стр. 52).
4. На стр. 39 указано, что поглощение лазерного излучения фотосенсибилизатором составляло около 20%. Исходя из величин молярного коэффициента $\sim 2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, концентрации Фотосенса 10^{-7} M и схемы установки на стр. 40, по-видимому, вкралась опечатка, и концентрация Фотосенса была на порядок ниже (см. стр.47), либо поглощение излучения лазера не превышало $\sim 2\%$.
5. Обозначения столбиков на гистограммах (Рис. 1-5 и 8 автореферата и соответствующие им рисунки диссертации) как ФДТ (фотодинамическая терапия) не совсем удачные, т.к. терапевтического эффекта представленные результаты не содержат, что подчеркивается подписями к этим же рисункам, в которых говорится о фотодинамическом воздействии (ФД-воздействии).
6. Обнаружение продукции NO с помощью измерения флуоресценции NO-чувствительного зонда DAF-2 является одним из основных методов в данной работе. Имеются литературные данные о том, что превращение DAF-2 во флуоресцирующую форму зависит от активности внутриклеточных пероксидаз. Этот фактор что следует учитывать при фотодинамической индукции активных форм кислорода, в частности, пероксида водорода, котрый может образовываться при использовании алюмофталицианинового Фотосенса.

Изложенные выше замечания имеют рекомендательный характер, не являются указанием на принципиальные ошибки, а скорее относятся к не всегда удачному стилю изложения. Несмотря на замечания, работа представляется новой, интересной, проведенной на высоком методическом уровне. Выводы, сделанные автором, подкреплены обширным экспериментальным материалом.

Необходимо особо отметить то, что, благодаря богатому методическому опыту работы с нервными клетками, накопленному в лаборатории проф. А.Б.Узденского, В.Д.Ковалевой удалось в ограниченный срок выполнить очень большой объем методически весьма разнообразной работы.

В целом диссертация представляет собой завершённое научное исследование, вносящее существенный вклад в изучение роли NO-зависимых сигнальных механизмов в повреждении нейронов и глии при ФД-воздействии. Работа В.Д. Ковалевой полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а диссертант заслуживает присвоения ему степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Главный научный сотрудник
лаборатории фундаментальных и
прикладных проблем боли
ФГБНУ «НИИ общей патологии и
патофизиологии» (г. Москва)
доктор биологических наук
Адрес: Россия, 125315 Москва, Балтийская ул., 8
Тел: +7 (499)134-14-45
e-mail: surin_am@mail.ru

 Сурин А.М.
23.03.2016

Подпись Сурина А.М. заверяю:
Ученый секретарь ФГБНУ «НИИОПП»
Кандидат медицинских наук



Скуратовская Л.Н.