

## 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*

Диссертационная работа Ковалевой В.Д. посвящена одной из современных проблем медицинской биофизики – исследованию механизмов устойчивости нейронов и глии к действию внешних повреждающих факторов, в частности к окислительному стрессу, вызванному фотодинамическим воздействием. Поскольку при фотодинамической терапии (ФДТ) мозга гибнут не только злокачественные нейроны и глиальные клетки, но и здоровые, выяснение механизмов устойчивости нервной ткани к фотодинамическому повреждению является очень важным и актуальным. Механизмы выживаемости нервной ткани под действием внешних факторов контролируется внутриклеточными и межклеточными сигнальными путями, в частности сигнальными путями, связанными с оксидом азота (NO). Сейчас многие исследователи изучают пути сигнальной трансдукции, контролируемые NO. Однако действие NO на нервные клетки и его роль в фотодинамически индуцированном повреждении нейронов и глии изучены недостаточно широко, а литературные данные достаточно противоречивы. Также не определена динамика генерации NO при фотодинамическом воздействии и не определены изоформы NO-синтаз, играющие решающую роль в гибели клеток. Следует отметить, что установленное участие оксида азота в фотодинамически индуцированном повреждении нейронов и глиальных клеток имеет существенное значение для понимания важной роли этого вторичного мессенджера в повреждении

нервных клеток, вызванном внешними воздействиями, в частности фотодинамическим воздействием. Стоит подчеркнуть, что работа также связана с изучением механизмов действия свободных радикалов и устойчивости клеток к окислительному стрессу. В связи с этим актуальность темы диссертационной работы не вызывает сомнения.

Новизна данной работы состоит в том, что впервые оценена продукция NO при фотодинамическом воздействии и динамика активации NO-синтазы после ФД-воздействия. Автором показано, что при фотодинамическом воздействии NO участвует в процессах повреждения нейронов и глии рецептора растяжения рака, а именно, индуцирует апоптоз и препятствует некрозу глиальных клеток.

Результаты исследования имеют большое теоретическое значение для понимания молекулярных механизмов NO-зависимых сигнальных процессов при фотодинамическом воздействии. Выявленная автором локализация фермента и данные ингибиторного анализа свидетельствуют о том, что NO-зависимые сигнальные процессы различаются в нейронах и глиальных клетках рецептора растяжения рака.

Представленные в диссертационной работе данные об активации NO-зависимых сигнальных механизмов при ФД-воздействии имеют важное практическое значение, так как могут быть использованы при оптимизации фотодинамической терапии в клинической практике, в частности для разработки методов более селективного разрушения злокачественных клеток при ФДТ опухолей мозга.

Анализ полученных результатов позволил диссертанту предложить гипотетическую концептуальную схему, отражающую участие NO-зависимых сигнальных механизмов в повреждении нервных клеток рецептора растяжения рака при фотодинамическом воздействии.

Структура диссертационной работы традиционна. Диссертация написана на 130 страницах текста. Литературный обзор включает анализ большого числа источников, главным образом, зарубежных. Кроме обзора

литературы в диссертации представлены введение, описание объекта и методов исследования, главы с полученными результатами и их обсуждением (3-4 главы), заключение, выводы, список литературы (186 источников). Иллюстративный материал включает 4 таблицы и 37 рисунков.

Автором представлен информативный литературный обзор, в котором рассматриваются как вопросы о роли NO и NO-синтаз в нейронах и глии, так и аспекты вовлеченности NO-зависимых сигнальных механизмов в повреждения нервных клеток, индуцированные фотодинамическим воздействием.

Проведенные автором исследования логичны и последовательны. Иллюстративный материал наглядно отражает результаты экспериментов. Работа выполнена на высоком методическом уровне. Для решения поставленных задач были использованы адекватные, современные методы физико-химической биологии, такие, как биоэлектрическая регистрация импульсной активности нейронов, флуоресцентно-микроскопическое исследование, ингибиторно-активаторный анализ, иммунофлуоресцентный и гистохимические подходы, а также исследование DAF-DA-флуоресценции. Все полученные экспериментальные данные подвернуты хорошей математической обработке с использованием дисперсионного анализа one-way ANOVA.

Все методы исследования освоены автором, и все из них применялись в диссертационной работе им лично. На основе обработки полученных данных Ковалевой В.Д. сделаны научные выводы. Научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы базируются на достаточном по объему статистически обработанном материале, обоснованы, логичны и полностью соответствуют целям и задачам исследования.

В третьей главе приводятся результаты исследования динамики активации NO-синтаз и генерации NO при фотодинамическом воздействии на рецептор растяжения речного рака, а также оценка влияния NO на нейронную активность и смерть нейронов и глиальных клеток рецептора

растяжения речного рака в темновых условиях и при ФД-воздействии. Показана роль нейрональной и индуцибельной NO-синтаз в повреждении нейронов и глиальных клеток при ФДТ, а также определена роль сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG в процессах повреждения нейронов и глии, индуцированном фотодинамическим воздействием. В четвертой главе автором обсуждаются и сравниваются с мировым уровнем полученные данные о роли NO в повреждении нейронов и глиальных клеток как в темновых условиях, так и при ФД-воздействии. В заключении автором приведена концептуальная схема NO-зависимых сигнальных механизмов в нейронах и глиальных клетках речного рака, активируемых фотодинамическим воздействием.

Интерпретация полученных диссертантом результатов интересна и подкреплена большим иллюстративным материалом, что позволяет считать представленную работу солидным и экспериментально подтвержденным трудом.

Выводы, сделанные автором, теоретически обоснованы, экспериментально подтверждены и в полном объеме изложены в 32 публикациях по теме диссертационного исследования. 9 работ опубликовано в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК или приравненных к ним, в том числе в иностранных изданиях, входящих в базы данных Scopus и Web of Science.

В то же время, работа не лишена и некоторых недостатков, в связи с этим, в качестве замечаний и пожеланий можно отметить следующее:

1. В работе подробно рассматриваются механизмы участия NO в развитии апоптоза и некроза как в темновых условиях, так и при фотодинамическом воздействии, но автор не рассматривает роль NO в аутофагии.
2. Из главы 2 «Материалы и методы исследования» не ясно, почему в качестве сенсора на оксид азота был выбран именно 4,5-диаминофлуоресцеин диацетат (DAF-2DA) и насколько он чувствителен к NO?

Однако, несмотря на замечания, представленная работа интересна как с практической, так и с теоретической точки зрения. Полученные результаты по участию NO-зависимых сигнальных механизмов в повреждении нейронов и глии при фотодинамическом воздействии могут способствовать выяснению молекулярных механизмов устойчивости нервных клеток к этому воздействию и оптимизации фотодинамической терапии.

По своей актуальности, новизне и содержанию работа В.Д. Ковалевой полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Минобрнауки России. Автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Ассистент кафедры биохимии  
Воронежского государственного  
медицинского университета  
имени Н.Н. Бурденко, к.б.н.  
Адрес: 394036, г. Воронеж,  
ул. Студенческая, д. 10  
Тел: 8(473)253-03-38  
e-mail: zov-bio@mail.ru

 О.В. Земченкова

