

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФГБУН Института  
химической физики им. Н.Н.Семенова

Российской академии наук,

д.х.н., проф., академик РАН А.А. Берлин



*Знамен*

2016 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ НА ДИССЕРТАЦИЮ  
КОВАЛЕВОЙ В.Д. «ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ NO-ЗАВИСИМЫХ  
СИГНАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ В УСТОЙЧИВОСТИ НЕЙРОНОВ И  
ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК К ФОТОДИНАМИЧЕСКОМУ ПОВРЕЖДЕНИЮ»,  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.02 – Биофизика

#### Структура и объем работы

Структура представленной диссертационной работы стандартна и состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части и обсуждения результатов (2-4 главы), заключения, выводов и списка литературы (186 источников). Иллюстративный материал включает 37 рисунков и 4 таблицы.

Обзор литературы, приведенный в работе, достаточно полно освещает вопросы, имеющие отношение к теме исследования. В нем отражены следующие аспекты: характеристика NO-зависимых сигнальных процессов в нервных клетках, механизм действия изоформ NO-синтаз и их локализация в нейронах и глии, а также виды клеточной смерти. В полной мере освещены вопросы, связанные с гибелью клеток, вызванной фотодинамическим (ФД) воздействием. Довольно подробно представлен обзор данных, касающихся роли NO в ФД индуцированном повреждении клеток. Главный итог этого обзора состоит в достаточно четкой формулировке нерешенных до сих пор вопросов чисто академического характера, связанных с влиянием фотодинамического воздействия

на статус монооксида азота (NO), предопределяющих необходимость проведения диссертационной работы.

Обращает на себя внимание разнообразие экспериментальных методов, использованных в диссертационной работе Ковалевой В.Д.. Они включают в себя биоэлектрические методы контроля активности механорецепторных нейронов, участвующих в растяжении речного рака, методы ФД воздействия с использованием фотосенсибилизаторов, флуоресцентно-микроскопическое определение некротических и апоптотических нервных клеток рецептора растяжения рака, гистохимическое определение локализации NADPH-диафоразы как маркера NO-синтаз, дополняемое иммунофлуоресцентным определением локализации этих ферментов в нейронах и глиях, составляющих указанный рецептор, и, наконец, использование флуоресцентных зондов NO, вошедших в экспериментальную практику только в последние годы. Поскольку эти зонды не обладают узкой избирательностью только в отношении NO, результаты этих измерений контролировались опытами с использованием нитроксильной ловушки NO – РТЮ, а также опытами с использованием ингибиторов NO-синтаз.

Достаточно подробное описание используемых в работе методик дает возможность легко воспроизвести и тем самым проверить результаты, полученные автором диссертации. В целом, внушительный набор использованных методов с использованием современных методов статистического анализа полученных результатов производит сильное впечатление, ставит проведённое исследование на уровень работ мирового уровня, далёко превосходящий уровень многих работ, проводившихся в нашей стране в области биологии NO.

Выявленная в диссертации локализация NO-синтаз и данные их ингибиторного анализа свидетельствуют о том, что NO-зависимые сигнальные процессы различаются в нейронах и глии рецептора растяжения рака. При ФД-воздействии NO генерируется в нейроне, и затем влияет на глиальные клетки, вызывая их апоптоз, и снижая некроз. Нейроглиальные взаимодействия, опосредованные этим вторичным мессенджером играют решающую роль в реализации процессов ФД индуцированного повреждения. На основании проведенных исследований предложена концептуальная схема NO-зависимых сигнальных механизмов в нейронах и глиальных клетках речного рака, активируемых фотодинамическим воздействием.

#### **Актуальность темы выполненной работы**

Как известно, фотодинамическая терапия (ФДТ) – метод селективного разрушения клеток опухолей, применяемый в онкологии, в частности для лечения опухолей мозга.

ФДТ индуцирует окислительный стресс, приводящий к гибели клеток. Однако при ФДТ в мозге погибают не только злокачественные клетки, но и здоровые нейроны и глиальные клетки. Поскольку влияние ФДТ на опухолевые клетки изучено широко, а механизмы воздействия на нормальные нейроны и глию практически не изучены, настоящее исследование представляется весьма актуальным. Процессы выживаемости нейронов и глии под действием повреждающих факторов контролируется межклеточными и внутриклеточными сигнальными путями. Важнейший сигнальный мессенджер – оксид азота (NO), в связи с этим исследование путей сигнальной трансдукции, контролируемых NO, представляет интерес. Однако действие NO на нервные клетки и его роль в ФД индуцированном повреждении нейронов и ГК изучено недостаточно широко, а имеющиеся данные противоречивы. Кроме того, актуально определение динамики генерации NO при фотодинамическом воздействии, так как еще не определены изоформы NO-синтазы, играющие решающую роль в гибели клеток при ФДТ. Поэтому, углубленное изучение NO-зависимых сигнальных механизмов при фотодинамическом воздействии является важной проблемой биофизики.

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

Ковалевой В.Д. были впервые проведены комплексные исследования NO-зависимых сигнальных механизмов в нейронах и глиальных клетках при ФД-воздействии на простом, но информативном модельном объекте - рецепторе растяжения речного рака. Также впервые была изучена динамика генерации NO при ФД-воздействии и локализация изоформ NO-синтазы в рецепторе растяжения рака. Было впервые показано, что динамика ФД индуцированной генерации NO и активации NO-синтазы в рецепторе растяжения рака состоит из двух фаз: резкой активации и торможения. Кроме того, выявлено, что NO стимулирует фотодинамически индуцированный апоптоз глиальных клеток рецептора растяжения рака и защищает нейроны и глиальные клетки от некроза, вызванного ФД-воздействием.

Полученные результаты отражены в заключительной гипотетической схеме, описывающей роль NO-зависимых сигнальных механизмов в повреждении нейронов и глиальных клеток речного рака при ФД-воздействии.

Результаты, полученные В.Д. Ковалевой, научно значимы, поскольку свидетельствуют о том, что воздействие на разные изоформы NO-синтазы представляет собой потенциальный способ модулирования типа клеточной смерти при фотодинамической терапии. Работа имеет фундаментальный характер. Её результаты

могут послужить основой для дальнейших исследований по оптимизации ФДТ. Данные о проапоптотическом действии NO на глиальные клетки и NO-опосредованной защите глии, полученные в ходе диссертационной работы, могут быть использованы для разработки методов селективного воздействия на глиальные клетки и защиты нормальных клеток при оптимизации методов фотодинамической терапии опухолей мозга. Результаты, представленные в работе, являются новыми и интересными, имеют значение как для науки, так и для практики. Итоги работы вносят вклад в решение проблемы по углубленному изучению роли NO-зависимых сигнальных механизмов в повреждении нейронов и глии при ФД-воздействии.

#### **Замечания по диссертации**

В целом диссертационная работа оставляет хорошее впечатление. Научная значимость, достоверность и обоснованность результатов, представленных диссертантом, не вызывают сомнения.

У нас нет принципиальных замечаний к диссертации. Имеется лишь одно замечание общего порядка. Автор диссертации придерживается парадигмы, доминирующей сейчас среди большинства исследователей в области биологии NO, а именно представления о том, что молекулы NO, функционирующие в тканях и органах животных, представлены в них преимущественно в свободной форме, в которой они высвобождаются из L-аргинина при его обработке NO-синтазами. Между тем, в настоящее время получены данные о том, что в живых системах NO может *in vivo* включаться в S-нитрозотиолы (RS-NO) и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами, Это включение обеспечивает защиту NO от губительного действия супероксида, обеспечивая его перенос на значительное расстояние и тем самым эндокринное действие NO. Показано, по крайней мере в наших работах (А.Ф. Ванин с сотрудниками), что в составе ДНКЖ монооксид азота сохраняет способность оказывать на биологические системы как позитивное регуляторное, так и негативное цитотоксическое действие.

В диссертации (на стр. 11-12) RS-NO и ДНКЖ упоминаются, но только в качестве основы для создания лекарств, как доноров NO. Между тем, включение этого агента в указанные нитрозо-соединения, может существенно определять механизмы его функционирования в живых системах.

Мы надеемся, что учёт нашего замечания окажется полезным в дальнейших исследованиях В.Д. Ковалёвой в области биологии NO.

Имеется ещё одно замечание к работе, касающееся цитотоксического действия пероксинитрита (стр. 14). Утверждается, что «при физиологических рН пероксинитрит стабилен, однако при патологических состояниях он быстро распадается (непонятно почему???), окисляя внутриклеточные мишени, оказывая тем самым цитотоксическое действие». Между тем пероксинитрит стабилен при щелочных значениях рН, а распадается после протонирования именно при физиологических рН ( W.Koppenol) на очень активный окислитель – гидроксильный радикал и диоксид азота. Что касается цитотоксического действия пероксинитрита, оно обнаруживается при его высоких концентрациях, возникающих, как правило, при функционировании индуцибельной NOS, при которых преодолевается уровень антиоксидантной защиты.

Сделанные замечания не носят принципиального характера и не умаляют основных достоинств рецензируемой диссертации.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Полученные диссертантом результаты могут быть использованы при проведении научно-исследовательской работы и в учебном процессе при чтении лекций по общему курсу “Биофизика” и спецкурсов по фотобиологии и молекулярной биофизике на Биологическом факультете Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, в Воронежском государственном университете, в Воронежском государственном медицинском университете им. Н.Н. Бурденко, в 1-ом Московском государственном медицинском университете им. И.М. Сеченова, Южном Федеральном Университете, Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Институте фундаментальных проблем биологии РАН, Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН и ряде других учебных и научных центров России.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа В.Д. Ковалевой имеет все необходимые элементы, позволяющие считать ее отвечающей требованиям ВАК (п. 9 Положения ВАК РФ о порядке присуждения ученых степеней), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Мы считаем, что актуальность представленной работы, перечень исследованных вопросов, научная новизна и возможности практического применения позволяют отнести ее к числу исследований высокого научного уровня.

По нашему мнению, по уровню выполнения и полноте представления в научных публикациях обсуждаемая диссертация заслуживает положительной оценки, а ее автор,

В.Д. Ковалёва – присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности – биофизика (03.01.02).

Диссертация рассмотрена на расширенном заседании лаборатории физической химии биополимеров Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук 15 февраля 2016 г. (протокол № 7).

Заведующий лабораторией физической химии биополимеров

Института химической физики им. Н.Н. Семенова

Российской академии наук,

доктор биологических наук, профессор

Российская Федерация, 119991, г. Москва,  
ул. Косыгина, дом 4,

Телефон: 8 (495) 939-72-00

Факс: 8(495) 651-21-91

E-mail: [vanin.dnic@gmail.com](mailto:vanin.dnic@gmail.com)

Подпись Ванина А.Ф. заверяю



Ванин Анатолий Федорович

*03.03.2016*

Собственноручную подпись  
сотрудника *А.Ф. Ванина*  
удостоверяю  
Секретарь