ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Шарифулиной Светланы Анатольевны «Эпигенетические механизмы регуляции реакций нервной ткани на фотодинамическое воздействие»,** представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертационная работа Шарифулиной Светланы Анатольевны «Эпигенетические механизмы регуляции реакций нервной ткани на фотодинамическое воздействие» является актуальной, прежде всего потому, что, несмотря на интенсивные исследования, в которых используется фотодинамическая терапия (ФДТ) для разрушения раковых клеток, включая опухоли головного мозга, механизмы нейродегенерации и нейропротекции нормальной нервной ткани при фотодинамическом воздействии практически не изучены. Это помогло бы оптимизировать режимы ФДТ при клиническом применении и разработать способы защиты здоровых нервных и глиальных клеток от ФД повреждения. Хотя реакции клеток на различные воздействия, включая ФДТ и их смерть, регулируются сложной системой внутриклеточной сигнализации, состоящей из тысяч белков, многие вопросы регуляции их экспрессии окончательно не установлены. В настоящее время разработаны новые методические подходы, позволяющие оценить экспрессию генов, кодирующие различные сигнальные белки. Однако, практически не исследовано влияние ФДТ на эпигенетические процессы в клетках нервной системы. Поэтому данная работа является одной из немногих, в которой с использованием новейших методов эпигенетики, изучены механизмы повреждения глиальных клеток и нейронов в ответ на фотодинамическое воздействие. Полученные данные могут способствовать уменьшению повреждающих эффектов фотодинамической терапии и минимизировать при этом повреждение здоровой нервной ткани.

Научно-практическая значимость работы определяется установлением следующих основных закономерностей:

1. Использование комплекса современных методов исследования на 3-х клеточных моделях позволило довольно точно оценить роль эпигенетических изменений в нервных и глиальных клетках при фотодинамическом воздействии. В работе оценены изменения экспрессии 112 сигнальных белков.
2. Впервые изучены фотоиндуцированные изменения уровня экспрессии эпигенетических белков в брюшной нервной цепочке речного рака и коре головного мозга мыши.

3. Установлено, что при фотодинамическом воздействии изменяется уровень экспрессии эпигенетических белков, регулирующих транскрипцию, ядерный импорт, апоптоз, модификации гистонов, пролиферацию и выживаемость клеток в брюшной нервной цепочке речного рака и коре головного мозга мыши.

4. Впервые выявлено, что метилирование ДНК участвует в фотоиндуцированном некрозе глиальных клеток, но не нейронов речного рака. Деацетилирование гистонов участвует в некрозе и апоптозе глии, но не нейронов речного рака при фотодинамическом воздействии.

5. Показано, что белок p53 является одним из основных белков, принимающих участие в апоптозе глиальных клеток речного рака, вызванном фотодинамическим воздействием.

6. Убедительно доказано, что изменения уровня эпигенетических белков зависят от временного интервала после фотодинамического воздействия и являются ткане- и видоспецифическими, характерными для нейронов и глии.

7. Полученные данные позволили выявить ранее неизвестные сигнальные факторы в реализации путей гибели клеток.

8. Не вызывает сомнения практическая значимость работы, так как полученные результаты вносят определенный вклад в установлении роли эпигенетических факторов в механизмах повреждения и защиты нейронов и глии прифотодинамическом воздействии. Эти результаты могут быть использованы при разработке селективных способов ФДТ опухолей мозга. Используя ингибиторы или активаторы эпигенетических белков, можно будет, в принципе, усилить фотоповреждение перерожденных клеток и защитить
окружающую здоровую ткань.

Диссертация Шарифулиной С. А. построена по традиционной схеме и состоит из введения, литературного обзора, глав материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и, что очень важно, дана перспектива будущих исследований. В диссертации дан список литературы и, а также списка литературы, включающего 227 отечественных и зарубежных источников.

Во введении автор четко формулирует актуальность работы, ее цели и задачи. Во введении представлены научная и практическая новизны работы, присутствуют положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор написан четко, хорошим литературным языком и состоит из 5 параграфов. В обзоре дан анализ имеющихся в литературе данных, убедительно разобраны фотодинамический эффект и окислительный стресс, охарактеризованы виды

клеточной гибели и подробно охарактеризованы эпигенетические механизмы в норме и при фотодинамическом воздействии, оценена роль белка p53 в механизмах гибели. Обзор хорошо иллюстрирован конкретными схемами и диаграмами, что облегчает его чтение. Нужно отметить, к сожалению, что литературный обзор большой и несколько перегружен информацией, свидетельствующей об эрудиции диссертанта, но не относящейся к теме работы. Желательно, чтобы в обзоре было заключение, которое подводит читателя к цели и задачам, проводимых диссертантом исследований.

В 3-ей главе подробно описываются материал и методы исследования. Работа проведена на двух объектах нервная цепочка рака и нейроны коры мыши. Необходимо подчеркнуть, что автор использовал самые современные методы - это и методы регистрации импульсной активности механорецепторного нейрона, использовались различные фармакологические воздействия, влияющие на течение и исход фотодинамического облучения, использовалось флуоресцентно-микроскопическое исследование для оценки способа гибели клеток после фотодинамического воздействия. И, наконец, самое важное для всей работы подробно описаны методы, позволившие провести протеомное исследование эпигенетических изменений в нервной ткани. Именно этот многочисленный арсенал методов позволил получить научно-значимые результаты.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью компьютерной программ. Однако, необходимо отметить отсутствие раздела статистической обработки полученных данных, какие использовались критерии оценки.

В главе «Результаты исследований» подробно изложены полученные автором данные. В первой части этой главы автор показала, что фотодинамическое воздействие приводило к прекращению нейронной импульсной активности, а через 8 часов к некрозу нейронов и апоптозу и некрозу глиальных клеток. Установлено, что ингибирование метилирования ДНК посредством 5-азацитидина и децитабина снижает уровень некроза глиальных клеток, но не нейронов рецептора растяжения рака, подвергнутых фотодинамическому воздействию, и при этом не влияет на апоптоз клеток глии. Следовательно, метилирование ДНК участвует в фотоиндуцированном некрозе, но не апоптозе глиальных клеток. В следующем разделе приводятся данные о роли деацелирования гистонов в фотоиндуцированной инактивации и гибели нейронов рака. Установлено, что ингибирование гистондеацетилаз посредством вальпроата, трихостатина А и SBHA снижает уровень фотоиндуцированного некроза и апоптоза глиальных клеток, но не некроза нейронов при ФДТ. Следовательно, деацетилирование гистонов участвует в

ФД-индуцированном некрозе и апоптозе глиальных клеток рецептора растяжения речного рака.

В следующем параграфе подробно описываются изменения активности белка p53 в ответ на повреждение ДНК прифотодинамическом воздействии. Установлено, что активирование белка p53 посредством теновина-1, ИТА, нутлина-3 и \\^К-1065 повышает уровень фотоиндуцированного апоптоза глиальных клеток. Следовательно, белок p53 вовлечен в апоптоз глиальных клеток, вызванный фотодинамическим воздействием.

Самыми интересными результатами являются данные, полученные с помощью протеомных чипов, позволившие изучить экспрессию 112 сигнальных белков. Убедительно продемонстрированно, что фотодинамическое воздействие на брюшную нервную цепочку речного рака и кору мозга мыши вызывает изменения экспрессии эпигенетических белков, направленные на подавление и повышение транскрипционной активности. Несомненный интерес представляют данные, что фактор транскрипции АР-1/с-.1ип, регулирующий выживание и смерть клеток, сверхэкспрессируется в нервной цепочке рака и мозге мыши через 2-4 часа после фотодинамической терапии.

Заключительная глава диссертации - это обсуждение результатов, написана хорошо, в ней действительно представлен анализ полученных данных. Полученные результаты позволили представить схему защитных и повреждающих процессов при фотодинамическом воздействии, убедительно доказав, что эпигенетические процессы вовлечены в механизмы повреждения нервной ткани. На основании полученных данных автор предполагает программу будущих исследований, направленных на выявление возможных маркеров диагностики и лечения фотоокислительного повреждения головного мозга и, используя фармакологические подходы, можно будет усилить фотоповреждение перерожденных клеток и защитить окружающую здоровую ткань. Выводы отражают результаты работы. Автореферат соответствует диссертации.

Автором опубликовано в отечественной и зарубежной печати 24 работы, 7 из которых опубликовано в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Принципиальных замечаний нет. Хотелось бы получить ответы на следующие вопросы, кроме замечаний, указанных выше: Почему нейроны при фотохимическом воздействии гибнут только путем некроза, хотя протеомный анализ не исключает апоптоз? Связано ли с этим определенные недостатки используемых методов, в частности флуоресцентно-микроскопических методов?

Таким образом, диссертация Шарифулиной Светланы Анатольевны «Эпигенетические механизмы регуляции реакций нервной ткани на фотодинамическое

воздействие», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, и выполненная под руководством профессора Узденского А.Б.., является законченной научно-квалификационной работой. В этой работе решена важная научно-практическая задача - изучены эпигенетические механизмы регуляции реакций нервной ткани на фотодинамическое воздействие. Работа соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сама автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 «Биофизика»

Гл. н. с. лаборатории нейробиологии и
фундаментальных основ развития мозга
ФГАУ «НЦЗД» Минздрава России,
профессор, доктор медицинских наук Пинелис В.Г.

Подпись Гл. н. с. лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга
ФГАУ «НЦЗД» Минздрава России,
профессора, доктора медицинских наук Пинелиса Всеволода Григорьевича заверяю.

Ученый секретарь ФГАУ «НЦЗД» Минздава России,
доктор медицинских наук Антонова Е..В.

29 марта 2016 г.

Почтовый адрес: 119991, Россия, г. Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр.1.

Рабочий телефон: +7 (916) 686-77-24

Адрес электронной почты: pinelis@mail.ru