

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
**ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**  
**РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

Россия 142432 г. Черноголовка Московская обл. Северный проезд, д.1. ИФАВ РАН

Тел: (496) 524-95-08 • Факс:(496) 524-95-08

09.03.2017г № 12321-9311/117



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИФАВ РАН,

член-корреспондент РАН, д.х.н.

Бачурин С.О.

« 9 » марта 2017 г.

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

**Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института  
физиологически активных веществ Российской академии наук**

на диссертационную работу Бережной Е.В.

«ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА И РОЛЬ ФАКТОРОВ  
ТРАНСКРИПЦИИ NF-κB, AP-1 И NIF-1 ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ  
ПОВРЕЖДЕНИИ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.02 – Биофизика

**Актуальность темы выполненной работы**

Работа Бережной Е.В. посвящена исследованию развития окислительного стресса, изменения функциональных характеристик митохондрий в здоровых нейронах и глиальных клетках и изучению участия факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1 в регуляции выживаемости клеток при фотодинамическом (ФД) воздействии. В настоящее время фотодинамическая терапия (ФДТ) рассматривается как чрезвычайно важная составляющая комплексного лечения в нейроонкологии, однако механизмы воздействия как индивидуальных фотосенсибилизаторов так и их фотодинамического воздействия на здоровые клетки мозга изучены недостаточно. Выяснение механизмов развития окислительного стресса в здоровых клетках мозга при ФД воздействии, выявление особенностей нейронального и глиального ответа и сравнение с токсическим эффектом

для раковых клеток помогло бы оптимизировать схемы лечения и разработать способы как усиления ФД-повреждения опухолевых клеток, так и защиты здоровых.

Окислительный стресс в мозге в значительной степени вовлечён в развитие различных патологических состояний, включая развитие нейродегенеративных последствий, и тесно связан с функционированием митохондрий. Кроме того, значительная часть фотосенсибилизаторов, в том числе исследуемый в данной работе радахлорин, способны аккумулироваться в митохондриях. Поэтому представляется логичной постановка задачи детального изучения развития окислительного стресса, влияния на содержание глутатиона как части антиоксидантной защиты клетки и на функциональную активность митохондрий ФД воздействия радахлорина. Известно, что при ФДТ активируется также ряд факторов транскрипции, регулирующих выживаемость клеток при окислительном стрессе, включая изучаемые в данном исследовании NF-κB, AP-1 и HIF-1. Всё вышесказанное позволяет говорить об актуальности поставленной задачи изучения участия митохондрий и факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в повреждении здоровых нейронов и глиальных клеток при ФД воздействии. Актуальность проведенных исследований и важность полученных данных подтверждается публикациями автора, как в рецензируемых российских, так и зарубежных изданиях.

**Степень обоснованности, достоверность и новизна научных положений и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертационная работа Бережной Е.В. является оригинальным исследованием, выполненном на смешанной первичной культуре нервных и глиальных клеток коры мозга крысы и также на изолированном механорецепторе речного рака с помощью современных методов флуоресцентной микроскопии и ингибиторного анализа. Автором впервые показано, что окислительный стресс, индуцируемый ФД воздействием радахлорина, усиливает генерацию супероксид-аниона и скорость перекисного окисления липидов (ПОЛ) как в культивируемых нейронах, так и в астроцитах коры мозга крысы, хотя развитие этих процессов в нейрональных и глиальных клетках различается. Для астроцитов автором показано увеличение уровня восстановленного глутатиона через 4 часа после ФД воздействия, что свидетельствует об адаптивной активации антиоксидантной защиты в клетках. С помощью флуоресценции красителя родамин 123 и аутофлуоресценции НАДН выявлены вызванные ФД воздействием изменения митохондриального потенциала (деполяризация) и энергетического метаболизма (снижение уровня НАДН). Автор показал, что наблюдаемые изменения в митохондриях

отчасти связаны с активацией НАД<sup>+</sup>-зависимого фермента PARP (поли(АДФ-рибоза)-полимераза), который, помимо основной функции репарации ДНК, также играет ключевую роль в гибели нейронов при иксайтотоксичности, ишемии и окислительном стрессе. Также с помощью методов флуоресцентной микроскопии и ингибиторного анализа на нервных и глиальных клетках механорецептора речного рака Бережная Е.В. продемонстрировала участие факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в процессах фотоиндуцируемой гибели клеток. По полученным данным с привлечением литературных источников автором предложена концептуальная схема, которая описывает изменения митохондриального метаболизма и роль факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 при ФД воздействии.

Результаты, полученные Е.В. Бережной, имеют научную значимость, как с точки зрения углубления имеющихся фундаментальных представлений об участии митохондрий и факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в повреждении здоровых нервных и глиальных клеток при ФД воздействии, так и для поиска решения проблем повышения эффективности ФДТ. Данные об участии фермента PARP и факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в фотоповреждении клеток могут быть использованы для разработки методов селективного воздействия на нервные и глиальные клетки при оптимизации методов ФДТ опухолей мозга. Результаты, представленные в работе, являются новыми и интересными и могут быть использованы при проведении научно-исследовательской работы и при чтении лекций по биофизике и нейробиологии на профильных кафедрах.

#### **Соответствие диссертации и автореферата требованиям положения ВАК**

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 (232 источника). Иллюстративный материал включает 27 рисунков и 1 таблицу. Обзор литературы, представленный в работе, достаточно полно освещает вопросы, имеющие отношение к теме исследования. В нем рассмотрены следующие аспекты: физические и биофизические основы ФДТ, клеточные механизмы повреждения ткани при ФДТ, применение ФДТ в медицине. Освещены вопросы, связанные с митохондриями и окислительным стрессом. Отдельный раздел посвящен факторам транскрипции, активирующимся при окислительном стрессе. Работа выполнена на современном уровне с использованием современных методов флуоресцентной микроскопии и ингибиторного анализа. В результате исследования получены новые данные о механизмах повреждения нервных и глиальных клеток при фотодинамическом воздействии. Всесторонний анализ полученных

результатов делает положения и выводы, сформулированные в работе, хорошо аргументированными и убедительными. Выводы соответствуют полученным данным. Работа хорошо документирована, приведенные данные достоверны. Основные результаты получены впервые и не были известны ранее.

В качестве достоинства работы следует отметить значительное число публикаций по теме диссертации, в том числе публикаций в иностранных журналах. Все результаты получены лично автором либо с его участием, что подтверждается опубликованными статьями в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и в материалах иностранных и российских конференций.

В то же время, по после ознакомления с работой остается ряд вопросов и замечаний.

Одним из интересных результатов является обнаружение увеличения восстановленной формы глутатиона после проведения облучения в астроцитах, но не в нейронах. Однако автор исследовал этот параметр только на одной временной точке - через 4 часа после облучения. Есть ли аналогичная реакция в нейронах, могла ли она быть обнаружена на более ранних временных интервалах остаётся вопросом, тем более, что генерация супероксид-аниона в нейронах увеличивается достоверно при меньшей интенсивности воздействия (т.е. раньше), по сравнению с астроцитами. Кроме того, в качестве контроля используется только состояние облучения без присутствия фотосенсибилизатора и не приводится сравнение с клетками без воздействия, что также вызывает вопрос - возможна ли активация глутатионовой системы защиты в случае нейронов в ответ на облучение само по себе.

Не совсем понятно, почему автор и в подписи оси графиков и в тексте говорит об измерении автофлюоресценции НАД(Ф)Н, а не (НАДН+НАД(Ф)Н), так как их автофлюоресценция не различима, или НАДН, в связи со значительно более высокой его долей. Тем более, что и в статье, на которую ссылается автор используют именно автофлюоресценция "НАДН".

При описании метода культивирования смешанной культуры нейронов и астроцитов автор ссылается на статью, где метод не описан, а также даётся только ссылка на другую статью, описывающую этот метод.

К замечаниям можно отнести и наличие грамматических ошибок, опуск и пропуск слов в тексте, а также некоторую небрежность в представлении экспериментальных данных. Так, автор в тексте говорит, что измерения прерывались на период облучения, но в рис. 2.2; 3.3; 3.4, 3.12, 3.14 и 3.15 временная шкала не учитывает эти интервалы, в отличии от рисунков 2.5, 3.7 и 3.8. Кроме того, расчёт времени

облучения для экспериментов, данные которых представлены в этих двух группах рисунков различается - в первом случае это время ближайшего обучения, а во втором сумма предыдущих облучений. Однообразное представление результатов облегчило бы значительно их восприятие и помогло бы их пониманию. На диаграмме Б рисунка 3.3 не понятно, что означают цифры 1, 2, 3 над колонками, в подписи к рисунку нет пояснений.

Однако сделанные замечания не снижают положительной оценки рецензируемой диссертации в целом.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Е.В. Бережной является законченной научно-квалификационной работой, имеющей существенное значение для понимания механизмов действия ФДТ на нормальные нейроны и астроциты. Актуальность представленной работы, перечень исследованных вопросов, научная новизна и возможности практического применения позволяют отнести ее к числу исследований высокого научного уровня. Диссертация Е.В. Бережной полностью соответствует всем требованиям «Положения ВАК», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Е.В. Бережная - заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности – биофизика (03.01.02.). Работа и отзыв обсужден и одобрен на расширенном заседании лаборатории биомолекулярного скрининга ИФАВ РАН 3 марта 2017 г. (протокол №2).

Гл.н.с. лаборатории биомолекулярного скрининга

ИФАВ РАН, к.х.н.

Российская Федерация, 142432,

Московская область, Ногинский район,

г. Черноголовка, Северный проезд, 1,

Телефон: 8(496)5242606, 8(916)0947282

Тел/факс: 8(496)5249508

E-mail: shevtsova@ipac.ac.ru

Подпись Шевцовой Е.Ф. заверяю

Е.Ф.Шевцова



**ТЕРЕНТЬЕВА И.И.**