

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Бережной Елены Викторовны «ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА И РОЛЬ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ NF-κB, AP-1 И NIF-1 ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Диссертационная работа Елены Викторовны Бережной «Изменения митохондриального метаболизма и роль факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1 при фотодинамическом повреждении нейронов и глиальных клеток» обладает несомненной актуальностью и научной значимостью. Исследование посвящено выяснению механизмов ответа клеток нервной системы на окислительный стресс, вызываемый действием фотодинамических красителей. Реакция клеток на окислительный стресс регулируется сложной системой внутриклеточной сигнализации. Автором работы особое внимание уделено митохондриям и ряду факторов транскрипции, а именно NF-κB, AP-1 и NIF-1. Митохондрии, с одной стороны, являясь источником активных форм кислорода (АФК), могут способствовать развитию окислительного стресса. С другой стороны, они сами являются важной мишенью окислительного стресса и способны при повреждении запускать процессы, ведущие к гибели клетки. Выживаемость клеток при окислительном стрессе также регулируется при участии факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1, участвующих в ответе клетки на изменение уровня АФК. Совокупность элементов и связей, задействованных в регуляции адаптивного ответа организма и отдельных клеток на стрессирующие воздействия, до настоящего времени полностью не установлена, что обуславливает несомненную актуальность получения новых знаний в данной области. Кроме этого, необходимо отметить высокую практическую значимость представленного исследования, поскольку фотодинамическое воздействие лежит в основе методов терапии ряда заболеваний, в том числе онкологических заболеваний мозга. Знание молекулярно-клеточных механизмов позволяет проводить целенаправленную работу по увеличению

эффективности упомянутого терапевтического подхода и, что важно, одновременному снижению возможных негативных эффектов на окружающую здоровую ткань.

Диссертационное исследование Е.В. Бережной построено по традиционной схеме. Работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), описания и обсуждения результатов (главы 3 и 4), заключения, выводов и списка литературы (232 источника). Иллюстративный материал включает 27 рисунков и 1 таблицу.

Во вводной части автором обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и задачи, обоснована научная новизна и научно-практическая значимость результатов, приведены сведения по апробации работы и публикациям.

Обзор литературы состоит из 3-х разделов. В первом из них описаны молекулярные механизмы, лежащие в основе фотодинамического воздействия, приведены сведения по используемым фотосенсибилизирующим красителям. Во втором разделе подробно описывается роль митохондрий в энергетическом обеспечении клеточных процессов и генерации активных форм кислорода. Рассмотрен механизм развития окислительного стресса, повреждение различных макромолекул, а также компоненты антиоксидантной системы защиты и их функции в поддержании жизнеспособности клетки. Особое внимание уделено транскрипционной регуляции ответа на окислительный стресс и роли некоторых ключевых факторов транскрипции. В заключительной части обзора литературы описаны клеточные механизмы повреждения клеток и тканей организма при фотодинамическом воздействии, в том числе клеточные мишени воздействия, особенности запуска различных типов клеточной смерти, участие исследованных автором факторов транскрипции и митохондрий. В целом, обзор сделан по большому количеству источников, в том числе современных, позволяет составить представление о современном состоянии науки в соответствующей области и хорошо обосновывает постановку целей и задач.

В главе Материалы и методы исследования приведены все необходимые сведения об использованных объектах, дизайне экспериментов, использованных методических подходах и особенности их реализации. Использованные диссертантом методы свидетельствуют о хорошем владении биофизическим инструментарием. Стоит отметить широкое применение методов, основанных на флуоресцентном анализе, позволяющих не только количественно измерить исследуемый параметр, но и проанализировать ответ индивидуальных клеток путем их визуализации. Автор использовал современные методы флуоресцентной микроскопии и электрофизиологии, а также активно применял ингибиторный анализ. Использованные методы и подходы, а также проведенная статистическая обработка результатов адекватны поставленным задачам.

В главах Результаты исследований и Обсуждение результатов подробно изложены полученные автором результаты и проведен их анализ. Работа Е.В. Бережной выполнена на двух модельных объектах разного систематического положения: первичной смешанной культуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы и абдоминальном механорецепторе растяжения речного рака. Автором работы установлено, что фотодинамически активный краситель радахлорин вызывает окислительный стресс, который характеризуется ускорением генерации супероксидного анион-радикала и повышением уровня перекисного окисления липидов в культивируемых нейронах и астроцитах. Отмечено также повышение содержания восстановленного глутатиона в астроцитах, что расценивается как адаптивный ответ. Наблюдаемый фотоиндуцируемый окислительный стресс в первичной сокультуре нейронов и астроцитов ведёт к изменениям митохондриального метаболизма, а именно митохондриальной деполяризации и падению уровня НАДН. С помощью ингибиторного анализа автор работы приходит к выводу, что наблюдаемые изменения отчасти связаны с активацией фермента поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP). Автор указывает, что дальнейшее развитие окислительного стресса ведёт к гибели клеток, которая регулируется, в том числе, факторами транскрипции. Вторая часть работы выполнена на механорецепторе речного рака.

Продемонстрировано, что факторы транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 участвуют в регуляции выживаемости клеток механорецептора речного рака при фотодинамическом воздействии фотосенса, а именно, все они участвуют в фотоиндуцируемом апоптозе глиальных клеток, факторы транскрипции NF-κB и HIF-1 также регулируют фотоиндуцируемый некроз глиальных клеток, а фактор транскрипции NF-κB вовлечён в фотоиндуцируемый некроз механорецепторного нейрона.

Анализ результатов с привлечением литературных источников позволил автору построить гипотетическую схему повреждения нейронов и глиальных клеток при фотодинамическом воздействии, которая описывает происходящие при этом изменения митохондриального метаболизма и участие исследованных факторов транскрипции. Схема приведена в заключительной главе диссертационного исследования.

Все полученные диссертантом результаты являются новыми и научно значимы, как с точки зрения углубления имеющихся фундаментальных представлений о реакции клеток нервной ткани на окислительный стресс, индуцируемый фотодинамическим воздействием, так и с точки зрения решения практических задач. Полученные данные об участии в повреждении клеток нервной ткани при фотодинамическом воздействии фермента PARP и факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 могут потенциально быть использованы при оптимизации фотодинамической терапии опухолей мозга.

Выводы диссертационного исследования обоснованы, достоверны, экспериментально подтверждены и отражают результаты работы. Автореферат соответствует диссертации. Все результаты получены лично автором либо с его непосредственным участием. Основные положения диссертационной работы представлены в 29 публикациях, 9 из них опубликованы в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

При ознакомлении с диссертационной работой возник ряд вопросов и замечаний:

1. В диссертационной работе при описании фотодинамического воздействия автор оперирует временем облучения. Более информативным является указание также и дозы облучения. Это позволит оценить

фоточувствительность объекта и сравнить данные с результатами, полученными в других экспериментальных системах.

2. Автором использован ратиометрический метод с использованием красителя C11 BODIPY 581/591. Окисление данного красителя трактуется автором работы как показатель скорости перекисного окисления липидов, в то же время в диссертации не приведен его механизм.

При описании методики, а также при описании результатов автором приводятся противоречивые сведения о том, какие длины волн возбуждения/регистрации флуоресценции какой форме красителя, окисленной или восстановленной, соответствуют, что затрудняет интерпретацию представленных данных.

3. В работе проанализирована динамика продукции супероксидного анион-радикала и перекисного окисления, при этом использовалась линейная аппроксимация для оценки скорости процесса после облучения. В то же время, сложность данных процессов и влияние на них разнонаправленных про- и антиоксидантных факторов, возможность активации быстрых защитных систем и т.п. могут потенциально вызвать изменение скорости в течение периода наблюдения. В связи с этим представляет интерес, наблюдались ли такие отклонения в экспериментах.

4. В работе указано, что нейроны механочувствительного рецептора рака не способны вступать в апоптоз. Какие механизмы такого запрета подразумеваются? Какой функциональный смысл, по мнению автора диссертационного исследования, может быть заложен в такую особенность этих клеток?

Сделанные замечания ни в коей мере не умаляют основных достоинств рецензируемой диссертации и не снижают общей высокой оценки качества выполненной работы.

Таким образом, работа Е.В. Бережной «Изменения митохондриального метаболизма и роль факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 при фотодинамическом повреждении нейронов и глиальных клеток», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук

и выполненная под руководством профессора А.Б. Узденского, является законченной работой и соответствует критериям, установленным «Положением и присуждении ученых степеней» для кандидатской диссертации (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, в редакции Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 № 748), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Доцент кафедры биофизики
Института биологии и биомедицины
федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования
«Национальный исследовательский
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»,
кандидат биологических наук,

Балалаева И.В.

« 13 » марта 2017 г.

Адрес: 603950, Нижний Новгород,
пр. Гагарина, 23, корпус 1,
Телефон: 8 (831)462-32-13,
e-mail: irin-b@mail.ru

Подпись Балалаевой И.В. заверяю



секретарь ИИИ
Ирина