

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Негинской Марии Александровны «Механизмы кальциевой сигнализации нейронов и астроцитов при фотодинамическом воздействии радахлорина»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 «Биофизика».

Диссертационная работа Негинской Марии Александровны «Механизмы кальциевой сигнализации нейронов и астроцитов при фотодинамическом воздействии радахлорина» 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 все еще остаются мало изученными. Поэтому оптимизация ФДТ для лечения опухолей мозга является важной задачей современной медицины. Для оптимизации фотодинамического (ФД) воздействия необходимо изучение сигнальных механизмов реакций здоровых нейронов и астроцитов, окружающих опухоль. В ответ на ФД воздействие во многих типах опухолевых клеток наблюдается повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле, вызванное активацией каналов плазматической мембраны или опустошением внутриклеточных кальциевых депо. Однако механизмы изменения уровня Ca^{2+} здоровых нейронов и глиальных клеток, вызванного ФДТ, до настоящего времени остаются практически не изученными. Поэтому данная работа является одной из немногих, в которой с использованием новейших методов флуоресцентной микроскопии, изучены механизмы кальциевой сигнализации нейронов и глиальных клеток в реакциях на фотодинамическое воздействие радахлорина. Полученные данные могут способствовать поиску путей, ведущих к 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 2-х клеточных моделях, рецептора растяжения речного рака и корковых нейронов и астроцитов крысы позволило довольно точно оценить влияние фотодинамического воздействия радахлорина на нейроны и глиальные клетки, распределение и накопление радахлорина в нервной ткани, а также механизмы

кальциевой сигнализации нейронов и глиальных клеток в реакциях на фотодинамическое воздействие.

2. Впервые установлено, что фотосенсибилизатор радахлорин быстро накапливается в нервной ткани и локализуется в основном в глиальной оболочке нейронов и в дендритах рецептора растяжения речного рака. ФД воздействие радахлорина постепенно прекращает импульсную активность нейронов и вызывает некроз нейронов, и некроз и апоптоз глиальных клеток даже в субнанолярных концентрациях.

3. Впервые выявлено, что ФД воздействие радахлорина вызывает существенные изменения уровня внутриклеточного кальция в культивируемых нейронах коры головного мозга крысы, которые менее выражены в астроцитах.

4. Убедительно продемонстрировано, используя ингибиторный анализ, что фотоиндуцируемое повышение уровня кальция в цитозоле нервных клеток опосредовано фосфолипазой C, которая производит инозитол-1,4,5-трифосфат, активирующий кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума. В последующем происходит генерация активных форм кислорода и, вероятно, инициация перекисного окисления липидов мембран нейронов и астроцитов.

5. Показано, что повышение концентрации кальция в цитозоле нейронов и астроцитов приводит к увеличению уровня Ca^{2+} в митохондриях и падению митохондриального потенциала, что может приводить к открытию высокопроницаемой митохондриальной поры.

6. Ca^{2+} -зависимый сигнальный механизм, опосредованный активацией фосфолипазы C, может быть вовлечен в ответ нейронов и глии на ФД воздействие, а также в фотоиндуцированную клеточную гибель.

7. Полученные данные позволили выявить ранее неизвестные сигнальные факторы в реализации путей гибели клеток головного мозга при ФД воздействии радахлорина.

8. Не вызывает сомнения практическая значимость работы, так как полученные результаты о высокой фотодинамической эффективности воздействия радахлорина на нормальную нервную ткань целесообразно учитывать при разработке методов фотодинамической терапии. Выявленные механизмы фотоиндуцированного повышения уровня внутриклеточного кальция в нейронах и астроцитах могут быть использованы для оптимизации режимов фотодинамической терапии путем фармакологической модуляции.

Диссертация Негинской Марии Александровны построена по традиционной схеме и состоит из введения, литературного обзора, глав материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения,

заклучения, выводов и, что очень важно, вытекает перспектива будущих исследований. В диссертации дан список литературы, включающего 157 отечественных и зарубежных источников. Работа хорошо иллюстрирована многочисленными диаграммами и таблицами.

Во введении автор четко формулирует актуальность работы, ее цели и задачи. Во введении представлены научная и практическая новизны работы, присутствуют положения, выносимые на защиту. Результаты работы были представлены во многих докладах на научных конференциях в России и за рубежом.

Литературный обзор написан четко, хорошим литературным языком и состоит из 3 параграфов. В обзоре дан анализ имеющихся в литературе данных, убедительно разобраны фотодинамический эффект и окислительный стресс, охарактеризованы виды клеточной гибели и подробно охарактеризованы изменения внутриклеточного Ca^{2+} и механизмы их возникновения в норме и при фотодинамическом воздействии. 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.

Во 2-ой главе подробно описываются материал и методы исследования. Работа проведена на двух объектах: нервная цепочка рака, нейроны и астроциты коры головного мозга крысы. Необходимо подчеркнуть, что автор использовал самые современные методы - это и методы регистрации импульсной активности механорецепторного нейрона, описаны методы, позволяющие изучить накопление и выход фотосенсибилизатора радохролина, что влияет 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 измерение внутриклеточного кальция, в том числе в эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях нейронов и астроцитах, оценить роль активных форм кислорода и перекисного окисления липидов в коре головного мозга крыс. Именно этот многочисленный арсенал методов позволил получить научно-значимые результаты.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью современных компьютерных программ. Для статистической оценки

достоверности отличий использовался однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (One Way Anova RM), а также χ -квадрат критерия Пирсона для сравнения качественных признаков.

В главе «Результаты исследований» подробно изложены полученные автором данные. В первой части этой главы автор установила спектральные характеристики радахлорина и показала, что он накапливается преимущественно в многослойной глиальной оболочке, окружающец нейрон. В результате исследования физиологических реакции нейронов рецепторов растяжения в ответ на ФД воздействие радахлорина было выделено три основных типа изменения импульсной активности нейронов, которые зависели от дозы препарата. Фотодинамическое воздествие радахлорина приводило к необратимому прекращению нейронной импульсной активности, а через 8 часов к некрозу нейронов, апоптозу и некрозу глиальных клеток.

В следующем параграфе подробно описываются данные, что ФД воздействие радахлорина стимулирует кальциевые осцилляции в нейронах и астроцитах коры головного мозга крысы. Установлено, что культивируемые нейроны более чувствительны к действию радахлорина, чем астроциты.

Самыми интересными результатами являются данные, полученные с помощью ингибиторного анализа механизмов возникновения кальциевых осцилляций нейронов и глиии коры головного мозга. Убедительно продемонстрировано, что фотоиндуцированные кальциевые осцилляции в нейронах и астроцитах крысы не зависят от внеклеточного кальция и обусловлены выходом ионов кальция из эндоплазматического ретикулума в цитозоль, опосредованным фосфолипазой С. Фотодинамическое воздействие радахлорина вызывает повышение уровня ионов кальция в митохондриях нейронов и астроцитов коры головного мозга крысы и падение трансмембранного митохондриального потенциала в клетках коры, не чувствительное к циклоспорину А.

Несомненный интерес представляют данные, что фотодинамическое воздействие радахлорина запускает процесс перекисного окисления липидов клеточных мембран вследствие активной выработки АФК. Фотоиндуцированное перекисное окисление липидов плазматической мембраны, вероятно, активирует фосфолипазу С – фермент, находящийся на клеточной мембране. Активация фосфолипазы С, в свою очередь, приводит к производству IP₃ в результате расщепления фосфотидилинозитол-4,5-дифосфата. Выработка IP₃ приводит к высвобождению ионов кальция из эндоплазматического ретикулума вследствие активации IP₃-рецепторов на

поверхности мембраны ретикулума. На основании анализа литературных данных и полученных результатов автором была построена концептуальная схема реакций нервных клеток на фотодинамическое воздействие радахлорина.

Таким образом, результаты данного исследования однозначно свидетельствуют о запуске кальциевого сигнального механизма в здоровых нейронах и астроцитах в ответ на ФД воздействие, что необходимо учитывать при применении ФДТ для лечения рака головного мозга, так как данный сигнал может участвовать в механизмах, приводящих впоследствии в развитии гибели здоровых нейронов и утере физиологических функций организма. Полученные данные о кальциевом сигнальном механизме ответа, опосредованном активацией фосфолипазы С, могут быть использованы при дальнейших исследованиях для оптимизации режимов ФДТ опухолей мозга.

Автором опубликовано в отечественной и зарубежной печати 20 статей и тезисов, 8 из которых опубликовано в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Принципиальных замечаний нет. Хотелось бы получить ответы на следующие вопросы, кроме замечаний, указанных выше:

1. Почему нейроны при фотохимическом воздействии гибнут только путем некроза?

2. Каков механизм медленного угнетения импульсной активности радахлорина и почему он связан с изменениями внутриклеточного кальция, а два других типа угнетения импульсной активности нет?

3. Почему результаты исследований роли активных форм кислорода и перекисного окисления липидов не отражены в выводах работы?

4. На основании каких данных автор предполагает возникновение митохондриальной поры, если опыты с циклоспорином А не выявили влияние на уровень Ca^{2+} ?

5. Почему кальциевый ответ астроцитов на радахлорин значительно меньше, чем в нейронах?

Таким образом, диссертация Негинской Марии Александровны «Механизмы кальциевой сигнализации нейронов и астроцитов при фотодинамическом воздействии радахлорина» 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 механизмы кальциевой сигнализации нейронов и астроцитов при фотодинамическом воздействии радахлорина.

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
Федеральное Государственное Автономное Учреждение «Национальный
Научно-Практический Центр Здоровья детей Детей» Министерства
Здравоохранения Российской Федерации,
119961, Москва, Ломоносовский проспект 2, стр. 1

Тел. +74991341445

E-mail pinelis@mail.ru

профессор, доктор медицинских наук

Пинелис В.Г.

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

Ученый секретарь ФГАУ «ННПЦЗД» Минздрава России,
кандидат медицинских наук



Сурков А. Н.

10 марта 2016 г.