

## ОТЗЫВ

официального оппонента Иванова Андрея Валентиновича  
на диссертационную работу **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.

В последнее десятилетие наблюдается медленный, но неуклонный рост первичной заболеваемости опухолями ЦНС, а метастатические опухоли мозга встречаются в 10 раз чаще. Эти опухоли относятся к группе опухолей с неблагоприятными показателями отдаленной выживаемости. Классический микронеурохирургический подход и удаление таких новообразований очень сложны и сопряжены с высоким риском повреждения важных функциональных структур и развития дополнительного неврологического дефицита. Сейчас идет активная разработка менее травматичных методик фотодинамического (ФД) лечения нейроэпителиальных опухолей. Однако, несмотря на обширные исследования ФД воздействия на опухолевые клетки, процессы, происходящие в окружающих опухоль здоровых клетках, остаются мало исследованными. Хотя для успешного практического использования ФД терапии (ФДТ) необходимо знать как механизмы повреждения опухолевых клеток, так и пути защиты нормальной ткани от нежелательных изменений. **Актуальность** и важность изучения механизмов ответа здоровых нейронов и астроцитов на ФД воздействие не вызывает сомнения. Ответ нейронов и астроцитов на окислительный стресс, развивающийся при ФДТ, во многом контролируется важнейшим вторичным посредником, ионами кальция. Исследованию механизма кальциевого ответа здоровых нервных клеток на ФД воздействие фотосенсибилизатора «Радахлорин» и посвящена работа М.А. Негинской.

Диссертация построена по классической схеме и состоит из введения, литературного обзора, главы, посвященной описанию материалов и методов исследования, раздела собственных результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 132 страницах

машинописного текста, включая список литературы и иллюстрации, содержит 39 рисунков, 1 таблицу и 157 ссылок на работы отечественных и зарубежных авторов.

Во **Введении** обоснована актуальность выбранной темы диссертационной работы, приводится описание состояния рассматриваемой проблемы, сформулированы цель и задачи исследований, основные положения, выносимые на защиту, новизна, научная и практическая значимость полученных результатов, представлен объем апробации результатов.

**Глава 1** представляет литературный обзор, в котором содержатся подробные сведения о фотофизических и фотохимических процессах, происходящих при ФД воздействии на клетки, используемых фотосенсибилизаторах и особенностях их ФД воздействия, возникающем при ФДТ окислительном стрессе. Здесь также описаны основные звенья кальциевой сигнализации клеток и дан обзор известных данных о роли ионов кальция при ФД воздействии. Обзор литературы включает данные большого числа литературных источников, преимущественно зарубежных.

Правда, нельзя не отметить некоторые ошибочные утверждения. Так, на с.12 синглет-синглетный переход  $S_1 - S_0$  назван «флуоресцентным», хотя, как известно, из синглета может быть либо люминесцентный, либо безызлучательный конверсионный переход. Флуоресценция и фосфоресценция идут только из триплетных состояний. Та же ошибка, взятая из [2] и [12], повторяется на рис.1.1. Правильнее было бы ориентироваться на классическую фотофизику А.Н. Теренина «Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений». Здесь же на с.15 утверждается, что «фотоны с длиной волны более 800 нм не обладают энергией, достаточной для возбуждения молекулы кислорода». Обладают! Молекула кислорода в основном состоянии имеет две полосы поглощения в ИК области с максимумами на 1070 нм и 1264 нм.

В целом достаточно подробный и хорошо организованный литературный обзор логически обосновывает цель и задачи исследования.

**Глава 2** «Материалы и методы исследований» отражает разнообразие объектов и современных методов, использованных в проведенной работе, а также показывает обоснованность выбора тех или иных методов, зондов или реактивов. В работе использованы электрофизиологические методы для регистрации физиологических реакций нейронов механорецептора речного рака на ФД воздействие, различные методики современной флуоресцентной микроскопии для изучения локализации и накопления фотосенсибилизатора, изучения фотоиндуцируемой клеточной гибели нейронов и глиальных клеток механорецептора, а также прижизненная регистрация параметров первичных клеточных культур с помощью флуоресцентных зондов. Дано подробное описание используемых в исследованиях методик. Ингибиторный анализ использован для более детального изучения задействованных в ответе звеньев кальциевой сигнализации. Используемые автором методики информативны и адекватны поставленным задачам. К сожалению, диссертантом не выделены в отдельный раздел используемые для возбуждения радахлорина источники излучения, хотя это сделано в автореферате.

В **Главе 3** автор подробно описывает результаты проведенных экспериментов. В первой части этой главы автор показала особенности накопления и локализации фотосенсибилизатора «Радахлорин», а также его высокую ФД эффективность в отношении нейронов и глиальных клеток механорецептора речного рака. М.А. Негинской впервые показано, что радахлорин быстрее накапливается в глиальной оболочке нейронов рецептора растяжения рака и установлено, что ФД воздействие радахлорина сильно изменяет импульсную активность нейронов и способно индуцировать гибель нервных клеток как путем некроза, так и путем апоптоза. Таким образом, автором впервые показано, что ФД воздействие радахлорина способно вызывать изменения в нормальном функционировании здоровой нервной ткани.

Вторая часть результатов посвящена изучению кальциевого ответа нейронов и астроцитов первичных смешанных культур нейронов и астроцитов коры мозга крысы. Негинской М.А. впервые установлено, что ФД воздействие

радахлорина вызывает изменение уровня внутриклеточного кальция в культивируемых нейронах и астроцитах. На основе проведенных экспериментов автор связывает механизм повышения уровня кальция с инициацией перекисного окисления липидов мембран и последующей активацией фосфолипазы C, которая производит инозитол-1,4,5-трифосфат, активирующий кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума.

В заключительной части главы показано влияние ФД воздействия радахлорина на митохондрии, в частности, на трансмембранный митохондриальный потенциал и уровень ионов кальция в митохондриях. Автором показано, что фотоиндуцируемое повышение уровня кальция в цитозоле приводит к изменению функционирования митохондрий нейронов и астроцитов. Впервые установлено что ФД воздействие радахлорина приводит к падению трансмембранного митохондриального потенциала и накоплению кальция в матриксе митохондрий, что может приводить к клеточной гибели, в частности, кальций- опосредованными сигнальными путями.

Полученные экспериментальные данные подвергались адекватной статистической обработке с помощью современного программного обеспечения.

В **Главе 4** приводится обсуждение полученных результатов, их сопоставление между собой и сравнение с данными литературных источников. Результаты проведенных М.А. Негинской исследований однозначно свидетельствуют о запуске кальциевого сигнального механизма в здоровых нейронах и астроцитах в ответ на ФД воздействие.

В **Заключении** автор приводит гипотетическую схему ФД воздействия радахлорина на нейроны и глиальные клетки, основанную на результатах проведенных исследований и литературных данных.

**Выводы** адекватно отражают результаты работы и обобщают результаты проведенных исследований, в полном соответствии с заявленными целью и задачами работы.

Защищаемые научные положения и выводы диссертации базируются на проведенном автором анализе научной литературы по механизмам ФД воздействия на клетки, используемым фотосенсибилизаторам, возникающем при ФДТ окислительном стрессе, основных звеньях кальциевой сигнализации клеток и роли ионов кальция при ФД воздействии, а также на большом экспериментальном материале, полученном диссертантом самостоятельно в систематических исследованиях, выполненных на высоком научно-методическом уровне.

Основные результаты диссертационной работы М.А. Негинской опубликованы в рецензируемых научных журналах, 8 из которых в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, в профильных сборниках научных трудов и неоднократно докладывались на российских и международных конференциях различного уровня, всего 20 публикаций.

Новизна полученных результатов подтверждается анализом работ других авторов по данной тематике, а также публикацией результатов диссертации в рецензируемых журналах.

Достоверность результатов диссертации определяется использованием М.А. Негинской современной аппаратуры, проведением экспериментов на большом количестве образцов с многократным повторением, тщательной отработкой методики измерений, использованием современных методов обработки данных, а также сравнением с независимо полученными результатами других авторов. Успешная апробация результатов работы на научных форумах и в рецензируемых журналах не вызывает сомнения в их достоверности.

### **Научно-практическая значимость полученных результатов**

Данные о влиянии ФД воздействия радахлорина на нормальную нервную ткань могут быть использованы для оптимизации режимов ФДТ при лечении опухолей мозга. Полученные в результате проведенных экспериментов данные позволили автору построить схему одного из кальций-опосредованных сигнальных механизмов, запускаемых в нейронах и астроцитах в результате ФД воздействия радахлорина. Результаты вносят вклад в понимание

фундаментальных основ процессов, происходящих в нервной ткани при фотодинамическом воздействии, что может помочь в улучшении метода фотодинамической терапии, сделав его более щадящим для здоровой ткани.

Автореферат адекватно отражает основное содержание диссертации. Содержание диссертации соответствует специальности 03.01.02 – биофизика.

Замечаний принципиального характера работа не имеет. Однако:

1. В Списке сокращений и на с.37 и с.38 употребляется термин «фотодинамическая диагностика». Это распространенная, к сожалению, ошибка. Нет такой диагностики! Есть «флуоресцентная диагностика» или, в крайнем случае, «фотодиагностика».
2. Методически не очень чисто использование He-Ne лазера для возбуждения радахлорина. Излучение 633нм лежит далеко от «красного» максимума поглощения радахлорина 660нм. Второй источник излучения полупроводниковый лазер на 654 нм попадает в пик поглощения радахлорина, но сравнивать их ФД воздействие практически невозможно.
3. В Главе 3 всюду в подрисуночных надписях (а также и в тексте) нигде не указаны параметры лазерного воздействия: длина волны и плотность мощности излучения. На большинстве графиков не указана точность измерений (пределы ошибок).

Диссертация недостаточно вычитана, в тексте встречается не выправленные опечатки и неудачные выражения. Однако, эти замечания не носят принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку работы.

Диссертационная работа **Негинской Марии Александровны** выполнена на высоком научно-методическом и экспериментальном уровне и представляет собой самостоятельную законченную научную квалификационную работу в области механизмов фотодинамической терапии, содержащую оригинальные результаты, совокупность которых вносит заметный вклад в понимание

механизмов ответа нейронов и глиальных клеток на фотодинамическое воздействие фотосенсибилизаторов хлоринового ряда.

Таким образом, по объёму выполненных исследований, актуальности, научно-практической значимости и новизне полученных результатов диссертационная работа **«Механизмы кальциевой сигнализации нейронов и астроцитов при фотодинамическом воздействии радахлорина»** полностью соответствует требованиям п. 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (ред.от 30.07.2014), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – **Негинская Мария Александровна** – заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.


Официальный оппонент  
ведущий научный сотрудник  
ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина»

Минздрава России  
доктор физико-математических наук,  
кандидат биологических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 115478, Москва, Каширское ш., д.24. Тел./факс +7(499) 324 9294

E-mail: ivami@yandex.ru

  
11.03.17.  
Иванов Андрей Валентинович

Подпись ведущего научного сотрудника доктора физико-математических наук  
Иванова А.В. заверяю.

Учёный секретарь  
ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина»  
Минздрава России  
кандидат медицинских наук



  
И.Ю.Кубасова