

В Диссертационный совет  
Д 212.038.03  
при Воронежском  
Государственном  
Университете

## 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

### Актуальность темы

Актуальность диссертационной работы Бережной Е.В. обусловлена важной ролью митохондрий и факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1 в реакциях клеток на окислительный стресс, вызванный образованием активных форм кислорода (АФК). Процессы внутриклеточного окисления являются ключевыми при индукции повреждения при фотодинамическом (ФД) воздействии на ткани и лежат в основе фотодинамической терапии (ФДТ). Это метод широко используют, как в медико-биологических исследованиях, так и в медицинской практике, в частности, в онкологии для разрушения опухолей. Однако гибнуть могут не только злокачественные клетки, но также окружающие опухоль нейроны и глиальные клетки, в мозге или ткани, подвергнутой ФДТ. В этой связи очевидна необходимость детального исследования механизмов чувствительности нейронов и глиальных клеток к ФД-воздействию. Краткое перечисление событий, происходящих в клетках при окислительном стрессе, указывает на актуальность исследования митохондриальных изменений и участия факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1 при повреждении здоровых нейронов и глиальных клеток, вызванном ФД-повреждением. Исходя из этого, Еленой Викторовной было проведено исследование таких важнейших показателей окислительного стресса, как скорости генерации АФК, ПОЛ, восстановленного глутатиона, изменений внутриклеточной концентрации свободного  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ), функционального состояния митохондрий (митохондриального потенциала и уровня NADH), а также участия факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1 в фотоиндуцированной гибели нейронов и глиальных клеток.

Изучение биофизических, биохимических и физиологических основ внутри- и межклеточных механизмов, повреждаемых при окислительном стрессе, является одну из наиболее активно развиваемых областей физиологии и медицины. Изучение этих механизмов чрезвычайно важно как для фундаментальной науки, так и для нужд клинической медицины при разработке методов диагностики и создания лекарственных средств протекторного действия. Таким образом, поставленная автором цель работы – исследовать изменения митохондриального метаболизма и участия факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 при фотодинамическом повреждении нейронов и глиальных клеток, является, несомненно, актуальной.

### **Новизна научных положений и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Бережная Е.В. впервые изучила показатели окислительного стресса, вызванного ФД-воздействием с участием радахлорина в роли генератора АФК с использованием в качестве модели первичной нейрону-глиальной культуры и из коры мозга крысы. Автор показала, что фотоиндуцируемый окислительный стресс ведёт к изменениям важнейших интегральных показателей функционального состояния митохондрий – электрического компонента трансмембранного потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ) и уровня NADH. В работе исследована роль ключевого фермента репарации повреждений ДНК, поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP-1), и высокопроницаемой митохондриальной поры в фотоиндуцируемых изменениях показателей митохондриального метаболизма. Автору впервые удалось оценить влияние модуляторов факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 на нейронную активность и гибель нейронов и глиальных клеток рецептора растяжения речного рака в темновых условиях и при ФД-воздействии. Елена Викторовна продемонстрировала, что все три фактора транскрипции AP-1, NF-κB и HIF-1 участвуют в апоптозе глиальных клеток механорецептора речного рака, причем первые два участвуют также и в некрозе глиальных клеток. В случае нейронов, участие в некрозе выявлено для фактора транскрипции NF-κB.

### **Теоретическая и практическая значимость полученных результатов**

*Теоретическая значимость* проведенного исследования состоит в том, что выяснение механизмов устойчивости нервной ткани к окислительному стрессу, вызванному ФД-воздействием, позволяет найти оптимальные пути решения ряда фундаментальных и прикладных биологических и медицинских проблем. Полученные диссертантом результаты и литературные данные были обобщены и объединены в гипотетическую

схему участия митохондрий и факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1 в реакциях нейронов и глиальных клеток на фотодинамическое воздействие.

**Практическая значимость** диссертационной работы заключается в расширении и углублении представлений об изменениях функционального состояния митохондрий и участия факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1 при ФДТ. Полученные результаты открывают новые перспективы для дальнейшей оптимизации этого метода с целью защиты здоровых нервных и глиальных клеток от ФД-повреждений. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о наличии потенциальной возможности модулировать тип клеточной смерти при ФДТ, воздействуя на факторы транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1.

В исследованиях внутриклеточной сигнализации с целью выяснения звеньев передачи сигнала, повреждаемых при ФДТ, чрезвычайно важным является выбор биологической модели. Бережная Е.В. использовала 1) первичную нейро-глиальную культуру из коры мозга крысы и 2) рецептор растяжения речного рака, морфологические характеристики которого позволяют достаточно детально изучить функциональные свойства, как нейронов, так и глиальных клеток. Благодаря удачному выбору биологических моделей, результаты проведенных исследований могут быть использованы при чтении лекционных курсов по общим и специальным дисциплинам, а также при проведении практических занятий, выполнении курсовых и выпускных квалификационных работ, магистерских диссертаций на биологических факультетах Университетов, в том числе, Воронежского государственного университета и Академии биологии и биотехнологии им. Д. И. Ивановского Южного федерального университета.

Достоверность и новизна научных положений и выводов диссертации обусловлена четкой логикой её построения, обоснованностью предлагаемых положений и выводов, надежной статистической обработкой данных.

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

Структура диссертации Е.В. Бережной стандартна для работ подобного рода. Работа написана на 129 страницах текста. В диссертации представлены: Введение, Литературный обзор, глава, содержащая описание объекта и методов исследования, главы 3-4, содержащие полученные результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы, список литературы (232 источников). Иллюстративный материал включает 1 таблицу и 27 рисунков.

В *Литературном обзоре* обобщены данные о физических механизмах ФД воздействия, сопоставлены структуры и свойства фотосенсибилизаторов. Рассмотрены основные биоэнергетические процессы при окислительном

стрессе, а также внутриклеточные механизмы ответов на ФД-воздействие с акцентом на системы антиоксидантной защиты и роль факторов транскрипции. Обзор литературы включает данные большого числа литературных источников, преимущественно зарубежных, причем около четверти ссылок достаточно свежие и относятся к периоду выполнения диссертационной работы.

**Экспериментальная часть** (Глава 2, Материалы и методы исследования) работы выполнена на современном научно-методическом уровне с использованием технологий выделения нейронов механорецептора речного рака, получением нейро-глиальных культур и последующего применения электрофизиологических, флуоресцентно-микроскопических методов и ингибиторного анализа. Используемые автором методики информативны и адекватны поставленным задачам. Исследование фотоиндуцируемого окислительного стресса и последующих изменений митохондриального метаболизма проводилось с помощью прижизненной регистрации флуоресценции потенциал-чувствительного зонда и аутофлуоресценции НАД(Ф)Н. Выживаемости нейронов и глии после ФД-воздействия исследовали посредством флуоресцентного окрашивания ядер нейронов и глии, а также ингибиторно-активаторного анализа, с использованием семи различных модуляторов факторов транскрипции NF- $\kappa$ B, AP-1 и HIF-1. Двойное окрашивание препаратов механорецептора пропидиум йодидом и Hoechst-33342 позволило определить соотношение нейрональных и глиальных клеток в фазе некроза или апоптоза. Результаты экспериментальной работы подвергались адекватной статистической обработке.

В главе **Результаты исследований** (Глава 3) приведены данные о скорости генерации АФК и ПОЛ и уровне восстановленного глутатиона при ФД воздействии радахлорина на нейроны и глиальные клетки. При похожих условиях изучены изменения митохондриального потенциала по флуоресценции зонда родамин 123 и аутофлуоресценции NADH. Также сделана попытка выявить причину митохондриальных изменений с помощью добавления ингибитора высокопроницаемой митохондриальной поры, циклоспорина А, и ингибитора фермента PARP-1, DPQ. Применение ингибиторного анализа позволило Елене Викторовне заключить, что ФД-воздействие вызывает активацию фермента PARP-1, что, в свою очередь, способствует падению уровня NADH в митохондриях и снижению  $\Delta\Psi_m$ . Ингибиторно-активаторный анализ участия факторов транскрипции NF- $\kappa$ B, AP-1 и HIF-1 в фотоиндуцируемой гибели нейронов и глиальных клеток речного рака свидетельствует об участии этих факторов в апоптозе

глиальных клеток. Также Бережной Е.В. обнаружено участие в фотоиндуцируемом некрозе глиальных клеток сразу двух факторов транскрипции – NF-κB и NIF-1, тогда как в некрозе нейронов проявляется участие только NF-κB.

В главе *Обсуждение результатов* (Глава 4) полученные результаты обсуждаются, сопоставляются между собой, а также с данными литературных источников. Совокупность полученных результатов об изменениях Ca<sup>2+</sup> гомеостаза, митохондриальной биоэнергетики, структурно-функционального состояния митохондрий, об участии фермента репарации ДНК и трех факторов транскрипции в процессах, запускаемых ФД-воздействием, анализ этих результатов с привлечением опубликованных работ позволили Бережной Е.В. в заключительной части Главы 4 привести общую схему участия митохондрий и факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1 в фотодинамическом повреждении нейронов и глиальных клеток. В целом, научная значимость, достоверность и обоснованность результатов, представленных диссертантом, не вызывают сомнения.

Основные положения диссертационной работы представлены в 28 публикациях, 9 из которых в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Автореферат и опубликованные по теме диссертации научные работы соответствуют содержанию диссертации.

***Работа не лишена, однако, и некоторых недостатков:***

1. Обзор литературы стал бы еще интереснее, если бы диссертант хотя бы вкратце отметила возможности применения флуоресцентных белков (killer-red fluorescent proteins) для генерирования АФК в качестве средств, альтернативных низкомолекулярным (синтетическим) хромофорам, типа хлорина.

2. Для анализа содержания работы было бы очень полезным, если бы в главе Обзор литературы Елена Викторовна привела спектры поглощения и флуоресценции радахлина и тех флуоресцентных зондов, которые были использованы в исследовании. Это дало бы четкое представление для читателя о том, в каких случаях перекрывание спектральных характеристик радахлорина и зондов могут осложнять измерения. Например, аккуратно подбирая индикатор, оптимальный для изменений [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, Е.В. Бережная указывает (стр. 48), что «...нельзя было использовать Fura-2 AM в связи с совпадением спектров возбуждения красителя и радахлорина, поэтому использовался Fluo-4 AM». Однако опубликованы данные о том, что радахолин в воде флуоресцирует при длинах волн выше 600нм (Belik V.P. et al Visible to near IR luminescence spectrum of Radachlorin under excitation at 405

nm, *Chemical Physics Letters* (Oct 24, 2016); Paul S. et al, Optimization in solvent selection for chlorin e6 in photodynamic therapy, *J. Fluorescence* **23** (2013) 283-291; см. также сайт со спектрами поглощения и флуоресценции радахлорина: [http://www.magicray.ru/PDT\\_Photodynamic\\_therapy/pharma/chlorin\\_e6.html](http://www.magicray.ru/PDT_Photodynamic_therapy/pharma/chlorin_e6.html) .

Поскольку флуоресценцию Fura-2 обычно регистрируют в диапазоне 500-550 нм, где радахлорин не флуоресцирует, то возможность использования двухволнового индикатора Fura-2 для регистрации  $[Ca^{2+}]_i$  заслуживала более тщательной проверки или более выверенной аргументации против Fura-2.

3. Автор указывает (стр. 50), что восстановленная и окисленная формы этидиума имеют спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции, различающиеся на десятки нанометров, что служит основой для радиометрического способа измерения окисления дигидроэтидиума супероксиданион радикалом, более аккуратного, чем одноволновой способ измерения. В то же время, длины волн возбуждения и регистрация флуоресценции дигидроэтидиума очень близки к тем, которые используют для регистрации флуоресценции внутриклеточного NADH. Следовало бы описать каким образом в радиометрическом способе измерения окисления дигидроэтидиума до этидиума учитывали вклад автофлуоресценции NADH, которая также снижается при ФД-воздействии (Рис. 3.12).

4. В подписях к рисункам, где представлены кинетические кривые роста флуоресценции этидиума (Рис. 3.4, 3.5), не указано регистрировали флуоресценцию на обеих длинах волн эмиссии (420 и 605нм) или только на одной (605нм). Другими словами, не ясно был ли действительно использован радиометрического способа измерения, иллюстрированный рисунком 2.2.

5. На Рис. 2.1 приведены изображения препаратов механорецептора речного рака, однако не отмечено какие ядра принадлежат нейронам, а какие глиальным клеткам, что, несмотря на высокое качество изображения, существенно снижают его информативность.

6. Известно, что более 70% NADH в нейронах сосредоточено в митохондриях (см., например, Ying W. (2006) NAD<sup>+</sup> and NADH in cellular functions and cell death. *Frontiers in Bioscience* 11: 3129 -3148), однако на Рис. 2.4 даже максимальный флуоресцентный сигнал NADH всего лишь на 25% превышает минимальный. Автору следовало бы объяснить с чем связан такой низкий вклад флуоресценции митохондриальной НАДН по сравнению с общим внутриклеточным пулом этого динуклеотида. На этом же рисунке дано определение «Скорости образования NADH» как тангенса угла наклона роста флуоресценции в ответ на блокаду дыхания цианидом. Не ясно, по какой причине Елена Викторовна игнорировала скорость диффузии циан-иона сквозь плазмалемму и скорость связывания этого аниона с комплексом IV дыхательной цепи как скорость-лимитирующие стадии суммарного процесса.

7. Из Рис. 3.15. очень трудно понять почему «..митохондриальная деполяризация в нейронах и астроцитах ... перед добавлением FCCP... составляла  $20 \pm 4\%$ .



Сделанные замечания не носят принципиального характера и не умаляют основных достоинств рецензируемого диссертационного исследования. Диссертация изложена очень хорошим языком и содержит немного помарок, вызванных излишним доверием к программе, проверяющей печать.

В целом диссертация представляет собой завершенное научное исследование, вносящее существенный вклад в изучение роли митохондрий и факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1 в повреждении нейронов и глии при ФД-воздействии. Работа Е.В. Бережной полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а диссертант заслуживает присвоения ему степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

Главный научный сотрудник лаборатории  
фундаментальных и прикладных проблем боли  
ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» (г. Москва)

доктор биологических наук

Сурин А.М.

Адрес: Россия, 125315 Москва, Балтийская ул., 8

Тел: +7 (499) 134-14-45; e-mail: [surin\\_am@mail.ru](mailto:surin_am@mail.ru)

*AS*  
13.03.20

Подпись Сурина А.М. заверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИОП»

Кандидат медицинских наук

*Л.Н.*

Скуратовская Л.Н.

