

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института биофизики клетки РАН
чл.-корр. РАН Е.Е. Фесенко



« 10 » марта 2017 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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.

Актуальность темы. Работа Негинской Марии Александровны посвящена исследованию роли Ca^{2+} в процессе фотодинамического повреждения здоровых нейронов и астроцитов, окружающих опухоль, под действием лазерного излучения в присутствии фотосенсибилизатора радахлорина. Эффект основан на том, что при селективном облучении клеток-мишеней фотосенсибилизатор генерирует синглетный кислород, оказывающий токсический эффект на опухолевые клетки и модифицирующее действие на их плазматические мембраны. Частичная засветка окружающих опухоль здоровых клеток может вызвать их повреждение, степень которого зависит от концентрации фотосенсибилизатора и интенсивности и длительности облучения. Метод фотодинамического разрушения лазерным излучением патологических клеток, окрашенных фотосенсибилизатором (ФС), в настоящее время широко применяется в медицине.

Новизна исследования, полученных результатов и выводов. Роль ионов Ca^{2+} , и механизмы активации Ca^{2+} -транспортирующих систем при облучении опухолевых клеток лазерным светом в присутствии фотосенсибилизатора хорошо изучена. В ответ на ФД воздействие во многих типах опухолевых клеток наблюдается повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле, вызванное активацией каналов плазматической мембраны и опустошением внутриклеточных кальциевых депо. Однако, данные о механизмах изменения уровня Ca^{2+} в здоровых нейронах и глиальных клетках под действием ФДТ, противоречивы и недостаточно изучены.

При исследовании влияния фотодинамического воздействия в присутствии известного фотосенсибилизатора радахлорина на нейроны и глиальные клетки в культуре и на активность нейрона-рецептора растяжения речного рака автором получено несколько принципиально новых и интересных результатов: впервые показано, что фотосенсибилизатор радахлорин быстро накапливается в нервной ткани (в течение 30

мин) и локализуется в основном в глиальной оболочке нейронов и в дендритах рецептора растяжения речного рака. ФД воздействие в присутствии радахлорина индуцирует процессы гибели в нейронах и глиальных клетках. При этом фотоиндуцируемое повышение уровня кальция в цитозоле нейронов происходит вследствие АФК-зависимой активации фосфолипаза С-зависимой мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных структур.

Анализ содержания диссертации. Диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 157 ссылок, из которых 134 на иностранном языке. Работа изложена на 132 страницах, включает 39 рисунков.

Во введении автором описано современное состояние исследований в области фотодинамического повреждения клеток и тканей. Обоснована актуальность развития технологий селективного уничтожения опухолевых клеток лазерным светом в присутствии фотосенсибилизаторов, генерирующих АФК.

Глава «Обзор литературы» включает три раздела, посвященные описанию известных фотофизических и фотохимических механизмов ФДТ фотосенсибилизаторов вообще и Радахлорина в частности, механизмов клеточной гибели и кальциевой сигнализации, особенности ФДТ опухолей мозга. В целом обзор литературы написан хорошим языком и логично структурирован.

Применяемые методы и используемые материалы достаточно подробно описаны в главе «Материалы и методы», что позволяет воспроизвести эксперименты без привлечения дополнительной литературы. Широкое применение в работе нашли флуоресцентные методы анализа отдельных клеток и клеточных популяций. При этом применялась современная аппаратура - инвертированный микроскоп Olympus и конфокальный микроскоп Zeiss 710 CLSM (Carl Zeiss, Германия). В целом, работа демонстрирует, что автор владеет основными методами клеточной биологии – флуоресцентной микроскопией, электрофизиологией, биохимией и обладает высокой методической квалификацией.

Глава «Результаты и обсуждение» содержит 2 раздела. В первом описано исследование фотодинамического воздействия в присутствии фотосенсибилизатора радахлорина на нейроны и глиальные клетки, а во втором описано изменение уровня ионов кальция в нейронах и астроцитах при ФД воздействии. В настоящее время радахлорин уже успешно применяется в качестве ФС для ФДТ различных видов опухолей. В настоящей работе показано, что радахлорин накапливается преимущественно в многослойной глиальной оболочке, окружающей нейрон за 30 минут. Выведение

радахлорина из нервной ткани более медленный процесс: через 2 часа выводится всего 11%. Что указывает либо на связывание радахлорина внутри клеток, либо на его модификацию.

Фотодинамическое облучение в присутствии 250 нМ радахлорина оказывало повреждающее действие на нейроны и глиальные клетки (вызывало некроз нейронов и некроз и апоптоз глиальных клеток) и подавляло импульсную активность рецептора растяжения рака. Продолжительность импульсации нейронов в среднем снижалась с 363 мин до 14 мин,

Во втором разделе показано, что фотодинамическое воздействие в присутствии радахлорина стимулирует кальциевые осцилляции нейронах культуры коры мозга крысы. Нейроны коры головного мозга крысы оказались более чувствительны к ФД воздействию радахлорина, чем астроциты. Облучение в присутствии радахлорина вызывало изменения концентрации ионов кальция в цитозоле большинства нейронов культуры и лишь в незначительном количестве астроцитов. С увеличением времени облучения частота и амплитуда ФД-индуцированных кальциевых осцилляций кортикальных нейронов увеличивались. Увеличивалось и количество возбуждаемых нейронов.

Для выяснения источников Ca^{2+} и Ca^{2+} каналов, принимающих участие в Ca^{2+} сигналах, автор оценил вклад внеклеточных ионов кальция в реакциях клеток в культуре на фотодинамическое воздействие. Отсутствие ионов кальция во внеклеточной среде не ингибировало ФД-индуцированные кальциевые осцилляции нейронов, указывая, что не деполаризация является причиной активации Ca^{2+} сигнализации.

Предварительное опустошение кальциевого депо эндоплазматического ретикулума (ЭР) путем ингибирования Ca^{2+} -АТФазы практически полностью блокировало фотоиндуцированные кальциевые осцилляции в нейронах, подтверждая упомянутые выше данные. Ингибирование фосфолипазы С подавляло фотоиндуцированные изменения уровня кальция, указывая, что кальциевые осцилляции в нейронах вызваны выходом кальция из ЭР вследствие активации фосфолипазы С и IP3 рецепторов.

Для выяснения путей активации фосфолипазы С автор исследовал роль радикалов кислорода и антиоксидантов в индукции кальциевых осцилляций клеток в культуре. Антиоксидант тролокс снижал количество погибших клеток, подтверждая предположение об участии АФК в повреждающем действии облучения. Однако достоверное увеличение скорости перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клетках первичной сокультуры наблюдалось только после 4 минут облучения, указывая, что активирующее действие облучения не обусловлено ПОЛ.

Для исследования роли Ca^{2+} в повреждении митохондрий автор далее исследовал изменения концентрации ионов Ca^{2+} в митохондриях нейронов и астроцитов при фотодинамическом воздействии. При облучении культуры нейронов и астроцитов в присутствии 200 нМ радахлорина светом с длиной волны 633 нм в нейронах после 15 мин облучения наблюдалось непрерывное повышение Ca^{2+} как в цитозоле, так и в митохондриях. В астроцитах $[\text{Ca}^{2+}]_c$ также непрерывно повышался при ФД воздействии. Резкое снижение $[\text{Ca}^{2+}]_m$ в астроцитах после 10 минут ФД воздействия свидетельствует о выходе Ca^{2+} из митохондрий вследствие фотоиндуцированного повреждения митохондриальной мембраны или же вследствие открытия высокопроницаемой митохондриальной поры, что обычно рассматривают в качестве первичного сигнала апоптоза.

При непрерывном фотодинамическом воздействии обнаружено падение митохондриального потенциала нейронов и астроцитов, которое также может быть следствием открытия РТР. Гиперполяризующий эффект радахлорина на митохондрии в работе не изучался, хотя и может быть связан с нарушением окислительного фосфорилирования. Ингибирование РТР циклоспорином А не повлияло на деполяризацию митохондриальной мембраны при облучении в течение 1 и 3 минут. На рисунке 3.31 падение потенциала не стимулируется ни радахлорином ни облучением, что противоречит рисункам 3.29 и 3.28 и не является надежным результатом.

Обсуждение представлено в общем виде. Не обсуждаются собственные конкретные экспериментальные данные. В тексте много не ясных утверждений: «ФД воздействие хлориновых ФС способно **менять клеточные механизмы** здоровой нервной ткани», или «изучение **фотоиндуцированных механизмов** ответа нейронов», или «**изменение внутриклеточной сигнализации** нейронов»

Обсуждение написано очень небрежно. Например, о роли Ca^{2+} : «**ФДТ повышает уровень** кальция в цитозоле клеток», «с последующим **трансфером** Ca^{2+} в митохондрии». «показано, что ФД воздействие радахлорина в первичной культуре нейронов и астроцитов **вызывает осцилляторный характер** изменения уровня Ca^{2+} в цитозоле клеток». «Одним из наиболее **частых механизмов** выхода Ca^{2+} из ЭР», «IP3 вырабатывается при активации **работы фермента PLC**», «В **рамках** данного исследования было показано».

Тем не менее, в целом следует отметить, что рецензируемая работа характеризуется четкой постановкой задач, высоким методическим уровнем их решения. Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также

совместно с другими соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследования на семинарах, конференциях и симпозиумах.

Содержание автореферата и публикаций по результатам работы полностью отражают основные положения диссертации. Заключение и выводы диссертационной работы соответствуют цели и задачам проводившихся исследований, конкретны, адекватны полученным результатам и не вызывают сомнений. Материалы работы хорошо представлены на нескольких конференциях.

Теоретическая и практическая значимость работы. Диссертационное исследование «Механизмы кальциевой сигнализации нейронов и астроцитов при фотодинамическом воздействии радахлорина» обладает несомненной значимостью с точки зрения прикладных исследований. Выполненная автором работа позволила установить механизм повреждающего действия лазерного облучения здоровых нейронов и астроцитов, связанный с активацией фосфолипаза С-зависимого выброса Ca^{2+} из внутриклеточных структур. Результаты работы могут быть использованы для разработки дополнительной терапии при операциях фотодинамического разрушения лазерным излучением патологических клеток, окрашенных фотосенсибилизатором радахлорином.

Вопросы и замечания. В работе использовались культуры клеток от 10 до 20 дней *in vitro*. Как показано в многочисленных исследованиях, культуры сильно меняются за этот период. Поэтому без специальных задач сравнивать ответы столь разных культур не обосновано. Анализируемые события получали с интервалом 10 секунд. Известно, что ошибка измерения амплитуд Ca^{2+} импульсов для возбудимых нейронов при этом может превышать 50 и более %. Не верное утверждение: «Аккумуляция Rh123 в митохондриях приводит к гашению флуоресценции зонда за счет перераспределения». Во-первых, не гашения, а тушения, и не за счет перераспределения, а за счет концентрационного тушения. Не указано, каков размер облучаемой лазером поверхности? По каким параметрам отличали нейроны от астроцитов? При больших временах облучения и высокой концентрации радахлорина показано глобальное повышение Ca^{2+} в клетках. Наблюдали ли корреляцию этого параметра с гибелью клеток? Применение одноволновых красителей не позволяет проводить количественные оценки и приводит к регулярным ошибкам. В работе не представлено достаточно контролей для одноволновых красителей. Например, рис.3.26 3.28 3.31 и др. Не ясно, сколько клеток усредняли, почему представлены ответ одной клетки. Не указано число экспериментов и число проанализированных клеток.

Заключение

Актуальность и научно-практическая значимость работы Негинской М.А. не вызывают сомнений. Несмотря на высказанные замечания, диссертационная работа «Механизмы кальциевой сигнализации нейронов и астроцитов при фотодинамическом воздействии радахлорина», в целом, удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям («Положение о порядке присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской от 24.09.2013 г. №842), а её автор, Негинская Мария Александровна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «биофизика».

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории внутриклеточной сигнализации ИБК РАН (протокол № от «10» февраля 2017 г.)

142290, г Пущино, Московской области, ул. Институтская д.3,

ФГБУН Институт биофизики клетки РАН

(495)925-59-84

E-mail: admin@ibfk.nifhi.ac.ru, vpz@mail.ru

Зинченко Валерий Петрович,
профессор, доктор биологических наук,
заведующий лабораторией внутриклеточной
сигнализации ИБК РАН

