

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Э.А. Гениной на диссертационную работу Южаковой Дианы Владимировны «*In vivo* флуоресцентный имиджинг в исследовании новых препаратов для иммуно- и фотодинамической терапии опухолей», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук в специализированный диссертационный Совет Д 212.166.21 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского, по специальности 03.01.02 — «Биофизика».

Несмотря на явные успехи, достигнутые в последние годы в области ранней диагностики и терапии рака, проблема борьбы с ним остаётся одной из актуальнейших в современной медицине. Диссертационная работа Южаковой Д.В. посвящена исследованию новых препаратов для иммуно- и фотодинамической терапии опухолей методом *in vivo* флуоресцентного имиджинга. **Актуальность** работы обусловлена как необходимостью разработки инновационных препаратов для диагностики и терапии опухолей, так и бесспорными преимуществами *in vivo* флуоресцентного имиджинга в исследовании новых противоопухолевых препаратов по сравнению с классическими методами. Данный подход позволяет изучить биораспределение новых флуоресцирующих агентов, в том числе фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии (ФДТ) опухолей без умерщвления животных в ходе эксперимента, а также легко отслеживать кинетику флуоресценции и фотовыгорания фотосенсибилизаторов в процессе облучения для анализа эффективности ФДТ. Особый интерес для разработки новых способов иммунотерапии опухолей представляют модельные опухоли, меченные генетически-кодируемыми флуоресцентными белками, которые, с одной стороны могут выступать в качестве дополнительных опухолевых антигенов, а с другой дают возможность *in vivo* мониторинга опухолевого роста и регрессии с помощью флуоресцентного имиджинга.

Южаковой Д.В. впервые методом *in vivo* флуоресцентного имиджинга получены данные о биораспределении и фототоксических свойствах двух новых флуоресцирующих металлоорганических комплексов. Впервые на флуоресцирующей опухолевой модели, коэкспрессирующей зелёный флуоресцентный белок EGFP и новый иммуностимулирующий цитокин OX40L α , продемонстрированы противоопухолевые свойства OX40L α . Впервые с использованием *in vivo* флуоресцентного имиджинга показана иммуногенность красного флуоресцентного белка KillerRed и проведена сравнительная оценка фототоксических свойств KillerRed в опухоли у мышей при воздействии непрерывного и импульсного лазерного излучения. Таким образом, **научная новизна** диссертации не вызывает сомнений.

Диссертация изложена на 104 страницах, содержит 33 рисунка и 6 таблиц. Работа включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы, содержащий 163 источника.

Анализ содержания диссертации.

Во введении имеется обоснованная и хорошо аргументированная постановка цели и задач исследования, показана научная новизна полученных результатов, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, приведена общая характеристика работы.

Глава 1 содержит обзор литературы, посвящённый роли *in vivo* флуоресцентного имиджинга в экспериментальной онкологии. В полной мере отражены вопросы, которым посвящено исследование. Имеются разделы, в которых представлены основы *in vivo* флуоресцентного имиджинга, а также преимущества и области применения данного метода в экспериментальной онкологии. Дается подробное описание применения *in vivo* флуоресцентного имиджинга в исследовании новых фотосенсибилизаторов для ФДТ, а также флуоресцентных белков, использующихся в качестве опухолевых антигенов. Обзор в основном основан на публикациях последних лет. В целом, обзор дает представление об изучаемой проблеме и свидетельствует о широком кругозоре автора, умении анализировать и обобщать литературные источники.

Материалы и методы, использованные в работе, детально описаны в главе 2. Выбранные методики являются современными, хорошо апробированными и оптимальными для решения поставленных в диссертации задач.

Результаты исследования и их обсуждение изложены в главе 3. Результаты представлены четко и последовательно, грамотно обработаны, документированы и проанализированы статистически.

Глава 3 содержит несколько разделов. В разделе 3.1 описаны полученные автором результаты о биораспределении двух новых порфиразиновых комплексов гадолиния и эффективности ФДТ с использованием комплексов методом *in vivo* флуоресцентного имиджинга. Показано, что порфиразиновые комплексы гадолиния избирательно накапливаются в опухоли. Установлено, что металлокомплекс, в периферийное обрамление порфиразинового макроцикла которого введены арильные фрагменты, обладает выраженными фототоксическими свойствами, отражающимися в снижении интенсивности флуоресценции комплекса в опухоли после облучения и торможении роста опухолей после ФДТ.

Раздел 3.2 посвящён оценке прижизненной экспрессии в опухоли и противоопухолевой активности нового иммуностимулирующего цитокина OX40L_{exo}

путём визуализации зелёного флуоресцентного белка EGFP, коэкспрессирующегося с OX40Lexo. Показана возможность прижизненной визуализации экспрессии OX40Lexo в модельной опухоли, коэкспрессирующей EGFP и OX40Lexo. Установлено, что экспрессия OX40Lexo в опухоли приводит к регрессии опухолей и развитию иммунологической памяти.

В разделе 3.3 представлены результаты исследования иммуногенности красного флуоресцентного белка KillerRed в опухоли у мышей с использованием *in vivo* флуоресцентного имиджинга. Продемонстрирована иммуногенность KillerRed, выражающаяся в снижении прививаемости и замедленном росте CT26-KR опухолей по сравнению с CT26 опухолями, в устойчивости к формированию повторно привитых CT26-KR опухолей и метастазов у мышей с ранее удалённой CT26-KR опухолью и в снижении интенсивности флуоресценции повторно привитых опухолей CT26-KR.

Раздел 3.4 посвящён изучению фототоксических свойств KillerRed при воздействии непрерывного и импульсного лазерного излучения. Установлено, что импульсный режим облучения опухолей способствует достижению максимума фотовыгорания KillerRed при меньшей световой дозе и отсутствии температурных эффектов по сравнению с непрерывным режимом. Подобран эффективный режим ФДТ с KillerRed опухолей у мышей с использованием импульсного лазерного излучения.

В заключении автор кратко приводит основные этапы работы и обобщает полученные результаты.

Выводы отражают полученные автором данные и полностью соответствуют поставленным целям и задачам работы.

В целом, работа производит впечатление законченного исследования, проведённого с использованием современных методов визуализации, результаты изложены грамотно и последовательно, обработаны статистически и отлично проиллюстрированы. Не вызывает сомнения **достоверность** полученных результатов. Разработанные с участием автора универсальные методики изучения биораспределения новых флуоресцирующих агентов и оценки их эффективности для ФДТ и иммунотерапии имеют высокую **практическую значимость** при проведении доклинических испытаний новых флуоресцентных препаратов для диагностики и терапии опухолей.

Тем не менее, диссертационная работа Южаковой Д.В. содержит ряд недостатков:

- 1) В диссертации не представлен список опубликованных работ по теме диссертации, и отсутствуют ссылки на собственные работы, что затрудняет оценку степени опубликованности и апробации результатов.

- 2) Обзор литературы недостаточно упорядочен и структурирован, встречаются смысловые и даже дословные повторы, например, на страницах 13 и 19, 13 и 22, 14 и 23, 36.
- 3) Отсутствуют выводы к главе 1, которые бы обобщили достижения мирового научного сообщества в данной области и подчеркнули необходимость исследований, представленных в диссертационной работе.
- 4) Встречается достаточно много опечаток и стилистических ошибок.
- 5) На рисунке 10 В вместо двух исследуемых агентов обозначен только один. Кроме того, результаты, представленные в части Г этого же рисунка, не согласуются с цифрами, указанными в соответствующем тексте на странице 37.

Указанные замечания относятся, в основном, к оформлению диссертации и не умаляют научной значимости данной работы.

Степень обоснованности полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Считаю, что автором выполнено законченное научное исследование, содержащее достаточное количество обоснованных результатов, степень достоверности которых подтверждается корректностью постановки *in vivo* и *ex vivo* экспериментов, широкой апробацией и надежностью использованных экспериментальных методов, соответствием экспериментальных данных, полученных разными методами, а также качественной и количественной согласованностью с результатами других исследований. Выводы в полной мере отражают полученные результаты и представляют достаточный научно-практический интерес. Основные положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно и правильно отражают новизну и оригинальность представленных результатов.

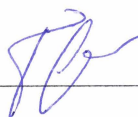
По основным результатам работы опубликовано 24 научные работы, из них 6 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в перечень ВАК, 1 патент на изобретение и 17 тезисов конференций. Результаты исследований были апробированы на 14 конференциях, включая всероссийские и международные.

Заключение

Диссертационная работа Южаковой Дианы Владимировны «*In vivo* флуоресцентный имиджинг в исследовании новых препаратов для иммуно- и фотодинамической терапии опухолей» представляет собой законченное научно-квалифицированное исследование, выполненное на актуальную тему и имеющее важное научное и практическое значение для биофизики. Работа отвечает требованиям пунктов 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства

Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, а её автор Южакова Диана Владимировна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 — биофизика.

Доцент кафедры оптики и биофотоники
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Саратовский национальный
исследовательский государственный
университет имени Н.Г. Чернышевского»,
доктор физико-математических наук

 Генина Элина Алексеевна
27.08.2018

410012, Саратов, Россия, ул. Астраханская, д. 83,
Телефон: +7 (8452) 210-716

