ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Лукиной Марии Максимовны «Флуоресцентная микроскопия с временным разрешением в изучении метаболизма опухолевых клеток при химиотерапии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 — «биофизика» (биологические науки).

Актуальность избранной темы

Диссертационная работа М.М. Лукиной посвящена разработке методических подходов к оценке метаболического статуса опухолевых клеток при химиотерапии на основе время-разрешенной флуоресцентной микроспектроскопии. Тематика работы находится в русле современных тенденций к стремительному развитию методов оптической микроскопии для решения широкого круга задач в области биологии и биомедицины. Тематика работы, несомненно, является актуальной, так как потребность в методах ранней диагностики и мониторинга эффективности противоопухолевой химиотерапии остается очень высокой. Мониторинг на основе параметров эндогенной флуоресценции кофакторов НАДН и ФАД является новым подходом к решению проблемы диагностики и мониторинга метаболических процессов в опухолевых клетках в процессе лечения и требует детальной разработки как in vitro, так и in vivo.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Диссертация М.М. Лукиной изложена на 107 страницах, содержит 13 рисунков и 8 таблиц. Диссертация оформлена в традиционной манере и состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Список литературы содержит 163 источника. В целом оформление диссертации соответствует требованиям, установленным Министерством образования Российской Федерации.

Во введении представлено обоснование актуальности перехода в разработке методик оценки уровня энергетического метаболизма раковых клеток от исследований в клеточных монослях к опухолевым моделям, сформулированы цель и задачи работы. Кроме того, и это меня немного удивило, во введении представлено описание научной новизны полученных результатов, научно-практическая значимость работы,

сформулированы основные положения, выносимые на защиту, дано обоснование достоверности полученных результатов, представлены данные об апробации работы. Мне всегда казалось, что во введении к диссертационной следует описывать новизну поставленных задач и возможное научно-практическое значение их решения, то есть обосновывать выбор темы (цели) и задач, а не представлять следом за формулировкой задач результаты их решения. Для этого есть заключение, куда было бы, на мой взгляд, уместно включить большинство этих подразделов. Но, возможно, так принято строить изложение работы в том диссертационном совете, где будет проходить защита.

Глава 1 содержит обзор литературы, в котором анализируются известные данные о ко-факторах НАД(Ф)Н и ФАД, процессах и метаболических реакциях, в которых они участвуют, их спектральные характеристики. Дано описание общих принципов оптического метаболического имиджинга. Рассмотрены особенности энергетического метаболизма опухоли. Перечислены используемые в клинике критерии ответа опухоли на лечение. В основе обзора литературы лежат в основном актуальные публикации последних лет. Обзор дает общее представление об изучаемой проблеме и свидетельствует о способности автора анализировать, систематизировать и обобщать опубликованные в научных статьях данные.

Глава 2 описывает материалы и методы, использованные в работе. В тексте подробно изложены методики измерений, ход эксперимента, алгоритмы анализа данных и их статистический анализ. Описаны объекты (клетки, клеточные сфероиды, мыши), на которых проводилось исследование, а также изучавшиеся химиопрепараты. Отмечу, что исследования были выполнены с использованием современных высокотехнологичных экспериментальных установок, что, несомненно, повышает надежность полученных данных. Выбор методов и методик исследования, на мой взгляд, является оптимальными для решения поставленных в диссертации задач.

В главе 3 изложены результаты проведенных исследований и представлено их обсуждение. Результаты изложены последовательно по степени усложнения экспериментальных систем, на которых проводятся исследования. В разделе 3.1 описаны результаты исследований метаболических изменений в опухолевых клетках монослойной клеточной культуры при химиотерапии. Продемонстрирована возможность мониторинга параметров флуоресценции исследуемых кофакторов в одиночных клетках в течение длительного периода времени. Выявлены отличия в динамике метаболических изменений в клетках, в зависимости от выраженности ответа опухолевых клеток на химиопрепарат.

Раздел 3.2 посвящён оценке метаболического статуса в клетках опухолевых сфероидов. Установлено, что опухолевые сфероиды изначально имеют метаболическую гетерогенность. Показано, что клетки наружного слоя сфероида более подвержены воздействию химиотерапии, чем клетки центральной области.

В разделе 3.3 представлены результаты исследования изменения энергетического метаболизма в мышиных опухолевых моделях при химиотерапии in vivo. Проведена прижизненная визуализация метаболического статуса клеток в составе растущей опухоли. Продемонстрирована возможность выявления самых ранних изменений в параметрах флуоресценции кофактора НАДН, вызванных химиотерапией, которые происходят до появления морфологических и ростовых признаков ответа опухоли на лечение.

Представленные во всех трех разделах данные измерений корректно обработаны, систематизированы и проанализированы на статистическую достоверность.

В заключении автор кратко описывает основные этапы работы и обобщает полученные результаты, а также проводит сопоставление этих результатов с данными литературы.

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

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения и выводы сформулированы в диссертации на основе применения научно-обоснованных теорий, систематизированных опубликованных научных данных и внутренне непротиворечивых результатов оригинальных исследований, проведенных автором диссертации. Исследования были проведены с использованием современного исследовательского оборудования на правильно подобранных экспериментальных моделях. Разработанные методики оценки метаболического статуса живых опухолевых клеток на основе флуоресцентной время-разрешенной микроскопии эндогенных кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД прошли успешную апробацию в исследованиях на нескольких экспериментальных клеточных системах с применением различных по механизму действия химиотерапевтических соединений. Наблюдаемые эффекты были прослежены и подтверждены на разных уровнях организации модельных систем: монослои клеток, клеточные сфероиды, привитые опухоли животных. Показаны схожие изменения метаболических параметров в опухолевых клетках in vitro и in vivo в ответ на

химиотерапию. В основу выводов положены статистически достоверные данные Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, у меня сомнений не вызывает.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Результаты диссертационной работы М.М. Лукиной получены с помощью нового метода флуоресцентной время-разрешенной микроскопии и широко применяемых методов экспериментальной биологии и биомедицины. Полученные данные подтверждены общепринятыми статистическими методами анализа и не противоречат современным научным представлениям и теориям по тематике работы.

Результаты диссертационной работы прошли апробацию и обсуждение на многочисленных российских и международных конференциях, а также рецензирование в научных изданиях при публикации статей на их основе. По материалам диссертации опубликовано 29 научных работ, из них 8 статей в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science, Scopus и в перечень ВАК.

Не возникает сомнений в том, что используемый в работе метод время-разрешенного флуоресцентного имиджинга был корректно применен для решения поставленных задач, полученные результаты и выводы достоверны, а дальнейшее развитие этого метода может иметь практическое применение в онкологии.

Наиболее значимыми (по новизне и с точки зрения практики) результатами диссертационной работы, на мой взгляд, являются доказанная на мышиных опухолевых моделях возможность прижизненной визуализации метаболического статуса опухолевых клеток и возможность регистрировать метаболический отклик опухолевых клеток на лечение химиопрепаратами с различными механизмами действия до появления морфологических и ростовых признаков ответа опухоли на лечение.

Данные об изменении в метаболизме опухолевых клеток при химиотерапии, полученные на клеточных монослоях, сфероидах и привитых опухолях обладают несомненной новизной и имеют большое значение, как базис для развития новых способов мониторинга эффективности химиотерапии на ранних стадиях лечения опухолей.

Результаты диссертации могут быть использованы для начала внедрения флуоресцентного имиджинга с временным разрешением в клинические исследования для задач опухолевой диагностики.

У меня есть следующие замечания по тексту диссертационной работы:

Во введении: Из предложения «метаболический имиджинг, который включает в себя анализ отношения интенсивностей флуоресценции (редокс–отношение)…» не ясно отношение каких интенсивностей флуоресценции имеется в виду, и что конкретно подразумевает автор под «редокс-отношением».

В формулировке цели стоило бы уточнить метаболический статус чего должна оценивать разрабатываемая методика

В подписи к рис. 3 не описано, что за спектры приведены на панелях А и Б. Из текста (стр. 15) следует, что на рисунке 3 приведены спектры поглощения и эмиссии, но название шкалы абсцисс на графиках - интенсивности флуоресценции.

Согласно требованиям ГОСТ десятичные знаки должны отделяться запятой, а не точкой.

В описании экспериментов на клетках с использованием химиопрепаратов (глава 2) не хватает деталей, в частности, сколько времени инкубировали клетки с препаратом до проведения исследований методами микроскопии, меняли ли среду перед внесением препарата, и в какой среде осуществляли инкубацию клеток с этим препаратом.

Было бы неплохо указать в тексте типичный размер сфероидов (и разброс их диаметров), на которых выполняли исследования методами микроскопии.

В описании условий измерения микроскопических изображений отсутствуют данные о пространственном разрешении (латеральное и аксиальное), с которым проводились исследования. «Размер» изображения в пикселях не является разрешением.

Хотелось бы, чтобы автор уточнила, как проводили измерения в экспериментах по «метаболическому имиджингу опухолей животных»: с поверхности опухоли или с некоторой глубины? Можно ли оценить толщину слоя опухоли, от которой измеряли изображения?

Приводя численные результаты и их погрешности следует округлять оба значения до значимых цифр (например, стр. 44: 80.02 ± 2.04, 77.82 ± 1.69 и т.п.).

На рис. 7 величины сравниваемых данных изменяются существенно, стандартные отклонения меняются не очень значительно, число измерений n=75 остается постоянным. Почему при этом величина p не изменяется и всегда равна 0,01? Сходная ситуация и вопросы по рис. 9 и 10.

При описании экспериментов с паклитакселом автор в тексте пишет, что флуоресценцию анализировали только в живых клетках (стр. 47), но на рисунке 8 приведены зависимости для мертвых клеток и далее в тексте обсуждаются параметры

флуоресценции для мертвых клеток. При этом на стр. 43 утверждается, что «мертвые клетки теряют автофлуоресценцию в канале для НАД(Ф)Н и ФАД». Здесь наблюдается некое противоречие и требуется пояснение автора.

В контрольных клетках в эксперименте с паклитакселом автор зарегистрировала снижение редокс-отношения через 24 ч после начала эксперимента (сир. 48). Наблюдались ли сходные изменения редокс-соотношения в таких же контрольных клетках в эксперименте с цисплатином? Если нет, то могут ли, по мнению автора, отличия в метаболизме клеток, наблюдаемые в разных контрольных измерениях, влиять на результаты исследований воздействия химиопрепаратов?

Стр. 53. «связи с этим, анализ значений редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н и времен жизни флуоресценции НАД(Ф)Н проводили отдельно для клеток наружного и внутреннего слоев». Здесь хотелось бы уточнить, насколько слоев или микрон отстояли друг от друга измеряемые «клетки наружного и внутреннего слоев».

В тексте диссертационной работы встречаются грамматические и стилистические ошибки, а также неточности и искажения в формулировках.

Ряд утверждений требует пояснений от автора. Например, на стр. 13 читаем, что «один атом глюкозы приводит к образованию 10 молекул НАДН…»

На стр. 15: «пируват попадает в митохондрии, которые окисляются до ацетил-коэнзим – А…»

Стр. 21: «Если в соматической клетке регистрируется редокс-отношения ФАД/НАДН при нормальных условиях, это может говорить о повышенной необходимости в образовании АТФ».

Стр. 22: «Такое прецессионное возбуждение флуоресценции исключает вероятность повреждения и фотообесцвечивания образца в процессе съемки». Согласно определению «прецéссия — явление, при котором момент импульса тела меняет своё направление в пространстве.»

Стр. 32: «Другим актуальным подходом для исследования энергетического метаболизма опухоли может быть его применение в противоопухолевой терапии».

Стр. 43 «При делении клеток на субпопуляции выживших и погибших не было выявлено статистически значимых различий. Также было установлено, что мертвые клетки теряют автофлуоресценцию в канале для НАД(Ф)Н и ФАД.» Если мертвые клетки теряют (т.е. она совсем исчезает?) автофлуоресценцию, а различий между живыми и мертвыми не обнаружено, то что тогда исследовали?

Стр. 44. «Значение процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н (a1) в процессе воздействия цисплатина на клетки снижалось…» Здесь хотелось бы уточнить, к чему относятся цифровые данные, приведенные в работе: это вклад флуоресценции свободной формы НАД(Ф)Н или вклад самого свободного НАД(Ф)Н?

Стр. 52: дублируется предложение «наиболее ранние и выраженные изменения в…» . Правильно ли я понимаю, что в первом месте это предложение явно лишнее и искажает смысл обсуждаемых зависимостей?

Указанные замечания не снижают научной значимости данного исследования, а общая оценка диссертационной работы М.М. Лукиной остается положительной.

Заключение

На основе изучения диссертации и опубликованных работ по теме диссертации, я могу заключить, что диссертационная работа М.М. Лукиной актуальна по теме и является логически завершенным исследованием, выполненным на современном экспериментальном уровне. Основные научные результаты диссертационной работы М.М. Лукиной получены впервые и опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ. Достоверность и обоснованность полученных результатов, научных положений и выводов сомнений не вызывает. Разработанные с участием автора универсальные методики прижизненного анализа метаболического статуса опухолевых клеток при химиотерапии имеют высокую фундаментальную и практическую значимость для онкологии.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. В нем правильно отражены основные результаты и выводы диссертации, новизна и практическая значимость результатов исследований.

Диссертационная работа М.М. Лукиной соответствует паспорту специальности 03.01.02 — биофизика. Актуальность работы, научная новизна, объем полученных данных и уровень исследований, фундаментальная и практическая значимость результатов отвечает требованиям пунктов 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24

сентября 2013 года (с изменениями на 1 октября 2018 года), а её автор Лукина Мария Максимовна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 — «биофизика».

Официальный оппонент

Профессор кафедры Биоинженерии Биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», доктор биологических наук _____ Феофанов Алексей Валерьевич

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»
Адрес: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1.
Телефон: +7 (495) 939-10-00
E-mail: avfeofanov@yandex.ru

Подпись д.б.н. Феофанова А.В. заверяю

Декан биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова,
академик М.П. Кирпичиников
05.06. 2020 г.