

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Гениной Элины Алексеевны на диссертационную работу Дружковой Ирины Николаевны «Флуоресцентный имиджинг с генетически кодируемым сенсором *SypHer2* в исследовании pH цитозоля опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук в специализированный диссертационный Совет

24.2.340.06 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского, по специальности 1.5.2 — «Биофизика».

Современная наука добилась больших успехов в понимании природы онкологических заболеваний и методов их лечения, тем не менее, проблема борьбы с раком остаётся одной из актуальнейших в современной медицине. Диссертационная работа Дружковой И.Н. посвящена исследованию pH цитозоля опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* с помощью методов флуоресцентного имиджинга. **Актуальность** работы обусловлена как необходимостью получения новых знаний о биологии опухоли, в частности об особенностях такого важного показателя гомеостаза клетки, как pH цитозоля, который определяет течение практически всех физиологических процессов, так и бесспорными преимуществами флуоресцентного имиджинга в исследовании динамических параметров клетки по сравнению с классическими методами. Применение флуоресцентного имиджинга с генетически кодируемым сенсором позволяет неинвазивно и точно отслеживать интересующие исследователя показатели живой клетки в реальном времени с высоким разрешением на протяжении длительного периода, в том числе при различных воздействиях. Для фундаментальной онкологии особый интерес представляет изучение такого важного параметра клеточного гомеостаза, как pH цитозоля при воздействии терапевтических агентов, в частности химиопрепаратов, поскольку известно, что данный параметр во многом определяет эффективность лекарственного лечения.

Дружковой И.Н. впервые предложены методики для изучения pH цитозоля опухолевых клеток на моделях разных уровней организации: клеточном монослое, опухолевых сфероидах *in vitro* и опухолях животных *in vivo* на основе флуоресцентного имиджинга с применением генетически кодируемого сенсора *SypHer2*; впервые проанализирована динамика pH цитозоля в отдельных опухолевых клетках в зависимости от их ответа на химиотерапевтическое воздействие препаратов с разными механизмами действия (цисплатина и таксола), а также в опухолевых клетках *in vivo*. Полученные данные на моделях всех трех уровней организации хорошо согласуются между собой. Впервые показаны разнонаправленные изменения pH цитозоля опухолевых клеток и

стромальных клеток (фибробластов) при их взаимодействии *in vitro*. Таким образом, **научная новизна** диссертации не вызывает сомнений.

Диссертация изложена на 109 страницах, содержит 33 рисунка и 2 таблицы. Работа включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы, содержащий 192 источника.

Анализ содержания диссертации.

Во введении представлено подробное обоснование цели исследования, сформулированы конкретные задачи, решение которых способствуют достижению цели, показана научная новизна полученных результатов, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, приведена общая характеристика работы.

Глава 1 содержит обзор литературы, посвящённый рН цитозоля эукариотических клеток, его роли в физиологических процессах, способах регуляции, а также особенностях рН опухолевых тканей. В полной мере отражены вопросы, которым посвящено исследование. Имеются разделы, в которых представлена роль рН цитозоля в опосредовании терапевтического воздействия химиопрепаратов на опухолевые клетки. Дается подробный обзор методов регистрации рН цитозоля от классических инвазивных подходов до современных высокотехнологических и безопасных методов. Дается подробное описание методов на основе флуоресцентного имиджинга с применением как экзогенных, так и генетически кодируемых сенсоров. 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 оптимальны 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 определения значения рН цитозоля опухолевых клеток в двумерных и трехмерных моделях *in vitro*. Показано, что рН цитозоля клеток HeLa Kyoto, использованных в работе, в клеточном монослое соответствует литературным данным и, следовательно, подтверждает корректность работы генетически кодируемого сенсора SypHer2. Подробно описан процесс роста и развития опухолевых сфероидов,

проанализирована интенсивность сигнала сенсора на разных глубинах сканирования объемного объекта и характер изменения сигнала с глубиной для двух длин волн. Полученные данные позволяют убедиться в корректности измерений, проводимых в плотном объекте исследования. Установлены отличия значений рН цитозоля опухолевых клеток внутреннего и наружного слоя опухолевых сфероидов.

Раздел 3.2 посвящён оценке изменений рН цитозоля опухолевых и стромальных клеток (фибробластов) при их взаимодействии *in vitro*. Показаны разнонаправленные изменения рН цитозоля: у опухолевых клеток - в сторону закисления, у фибробластов – в сторону защелачивания, равные по величине. Данное наблюдение подтверждает формирование устойчивой метаболической пары опухолевая клетка/стромальная клетка.

В разделе 3.3 представлены результаты исследования рН цитозоля опухолевых клеток *in vivo*, показана гетерогенность опухоли по уровню внутриклеточного рН. Распределение зон с разными значениями рН цитозоля соотнесены с гистологической структурой опухоли и распределением зон гипоксии и некроза.

Раздел 3.4 посвящён изучению изменения рН цитозоля опухолевых клеток при воздействии цисплатина. В исследованиях *in vitro* показана способность выживающих опухолевых клеток поддерживать щелочной рН на протяжении длительного времени в отличие от погибающих клеток. В трехмерной *in vitro* модели показаны отличия динамики рН цитозоля опухолевых клеток, расположенных в центре и на периферии сфероидов. Также продемонстрировано закисление цитоплазмы опухолевых клеток в ответ на терапию цисплатином *in vivo*.

Раздел 3.5 содержит данные о мониторинге рН цитозоля опухолевых клеток при воздействии химиотерапевтического препарата таксол. Эксперименты проведены по той же схеме, что и для препарата цисплатин, что позволяет проводить сравнительный анализ полученных данных. В отличие от цисплатина была установлена корреляция закисления цитозоля на фоне воздействия таксола со снижением пролиферативной активности опухолевых клеток. Аналогично предыдущему разделу были установлены отличия динамики рН цитозоля в погибающих и выживающих клетках. Отмечено, что наблюдаемые изменения рН цитозоля опухолевых клеток в ответ на терапию таксолом *in vivo* статистически не отличались от контроля.

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 методики регистрации pH цитозоля опухолевых клеток с применением флуоресцентного имиджинга и генетически кодируемого сенсора SypHer2 имеют высокую **практическую значимость** для проведения фундаментальных исследований при разработке способов терапии опухолей.

Тем не менее, диссертационная работа Дружковой И.Н. содержит ряд недостатков, в частности:

1. в диссертации отсутствуют ссылки на работы автора, опубликованные по результатам исследований и/или перечень этих публикаций;
2. отсутствуют выводы в обзорной главе, которые позволяли бы подытожить представленную информацию логично перейти к изложению непосредственно исследований автора;
3. присутствует достаточно много опечаток.

Тем не менее, 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 vitro* и *in 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 20 научных работ, из них 8 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus, РИНЦ), входящих в перечень ВАК, 1 патент на изобретение и 11 тезисов конференций. Результаты исследований были апробированы на всероссийских и международных конференциях.

Заключение

Диссертация Дружковой Ирины Николаевны «Флуоресцентный имиджинг с генетически кодируемым сенсором SynHer2 в исследовании pH цитозоля опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*» представляет собой научно-квалификационную работу, которая является законченным исследованием, выполненным на актуальную тему и имеющим 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 Дружкова Ирина Николаевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 — биофизика.

Профессор 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 Э.А.

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

Генина Елена Алексеевна

Дата 26.08.2021 г.

