

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

заведующей отделом химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза
Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный
медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора медицинских наук
М.Г. Якубовской 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».

Актуальность избранной темы

Визуализация молекулярных событий с помощью флуоресцентно-меченных соединений широко используется для решения фундаментальных и прикладных задач биофизики, биохимии и молекулярной биологии. Этот подход обладает несомненными достоинствами, включая простоту проведения, высокую чувствительность, наглядность и низкую токсичность, что обуславливает перспективность и целесообразность его развития. В настоящее время визуализация молекулярных событий становится также наиболее распространенным компонентом исследований в области экспериментальной онкологии, направленных на решение диагностических задач и определение ответа опухоли на проводимое лечение в режиме реального времени.

Одним из наиболее важных параметров живой клетки, влияющих на течение практически всех физиологических процессов, является значение pH цитозоля. Существуют принципиальные различия pH цитозоля в нормальных и опухолевых клетках, однако практическое использование данного показателя в экспериментальной онкологии слабо развито, что в определенной степени связано с отсутствием простых и надежных методов его регистрации.

Изложенное выше определяет несомненную актуальность диссертационной работы Дружковой И.Н., целью которой является разработка методик определения pH цитозоля опухолевых клеток с использованием флуоресцентно-меченных соединений на различных моделях опухолевого процесса и получение с помощью разработанных методик новых данных по pH цитозоля опухолевых клеток в различных условиях, и в

том числе, при химиотерапевтическом воздействии.

Научная новизна и научно-практическая значимость исследования

В исследовании Дружковой И.Н. впервые применен новый трансгенный флуоресцентный сенсор, благодаря использованию которого стала возможна визуализация изменений показателя рН цитозоля опухолевых клеток *in vitro*. Разработка данного сенсора позволила впервые контролировать изменения внутриклеточного водородного показателя после воздействия химиотерапевтических препаратов, что несомненно имеет большое практическое значение в плане мониторинга процесса в ходе лечения. Автором предложена методика контроля водородного показателя опухолевых клеток *in vivo*, получены данные о распределении зон с разными значениями внутриклеточного рН в сопоставлении с морфологической структурой опухоли. Новизна полученных результатов подтверждена патентом РФ № 2014142436 «Способ регистрации внутриклеточного рН опухолевых клеток».

Разработанные в диссертационном исследовании методы визуального контроля внутриклеточного водородного показателя опухолевых клеток на основе трансгенного сенсора однозначно будут использованы в дальнейших исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo* в фундаментальных биофизических и молекулярно-биологических исследованиях особенностей поведения опухолевых клеток, а также при разработке новых видов противоопухолевого лечения. Эти данные важны в плане совершенствования химиотерапии злокачественных новообразований.

Результаты диссертационной работы Дружковой И.Н. будут использованы в образовательном процессе: они найдут свое применение в соответствующих разделах спецкурсов и в лекциях по биофизике и биологии опухолевой клетки.

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

Исследование Дружковой И.Н. основано на достижениях современной биофизики в области изучения физико-химических характеристик компонентов клетки и определении закономерностей флуоресценции флуорофоров в различных условиях микроокружения, а также на современных концепциях экспериментальной онкологии и молекулярной биологии, касающихся процессов жизнедеятельности в нормальных и опухолевых клетках. Основной целью научного исследования

Дружковой И.Н., четко определенной во Введении к диссертации, является определение закономерностей изменения рН цитозоля в опухолевых клетках при различных условиях микроокружения, и в частности, в условиях экспозиции опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам. Полученные в диссертационном исследовании результаты обобщены и адекватно отражены в положениях, выносимых автором на защиту, в выводах и практических рекомендациях, которые корректно сформулированы, логичны и соответствуют цели и задачам работы. Выводы диссертации хорошо согласуются с современными представлениями о закономерностях течения процессов жизнедеятельности в опухолевых клетках.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Достоверность положений, выводов и рекомендаций диссертационного исследования основывается на корректном анализе результатов, полученных с использованием современных биофизических и молекулярно-биологических методов, и адекватным выборе методов математической статистики для обработки данных. Новизна полученных данных подтверждена патентом РФ.

Результаты исследования были представлены и обсуждены на 11 научных конференциях и опубликованы в 8 печатных работах в журналах перечня ВАК. Работы, опубликованные по теме диссертации, в полной мере отражают ее содержание. Разработанные методики станут важным дополнением при проведении фундаментальных биологических и биофизических исследований. Полученные данные при проведении дополнительных исследований могут быть использованы в качестве теоретической базы для разработки новых подходов в терапии опухолей на основе сочетанного применения химиотерапевтических препаратов и препаратов, модифицирующих внутриклеточный рН.

Общая характеристика работы

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.

В обзоре литературы детально представлены современные данные о рН цитозоля эукариотических клеток, его роли в физиологических процессах и способах

регуляции. Особое внимание автор уделяет описанию особенностей рН опухолевых клеток с обсуждением значения данного показателя для эффективности химиотерапевтического лечения опухолей. В полной мере отражены методы регистрации рН цитозоля, применяемые ранее и в настоящее время. Характеризуя обзор литературы диссертационного исследования Дружковой И.Н., следует отметить, что автор демонстрирует исчерпывающие знания в области исследования, обсуждает все современные концепции, необходимые для обоснования цели и задач исследования и определения адекватных подходов к их решению.

В главе «Материалы и методы», автором подробно описаны применяемые в работе клеточные линии, модели опухолевого процесса, используемые *in vitro* и *in vivo*, приведена информация по используемому оборудованию и представлены наглядные схемы проведения экспериментов.

Глава 3 содержит результаты исследования и их обсуждение и разделена на несколько смысловых разделов. В начале главы автор подробно описывает эксперименты по анализу рН цитозоля опухолевых клеток *in vitro* в двумерных и трехмерных моделях, подтверждая корректность работы сенсора SypHer2 в живой клетке, а также демонстрируя возможность регистрации сигнала сенсора в трехмерном объекте, которым в данном случае является опухолевый сфероид.

Далее автором представлены результаты исследования рН цитозоля опухолевых клеток *in vivo*. Дружкова И.Н. продемонстрировала возможность регистрации сигнала сенсора в процессе естественного роста подкожной опухоли у животных. Данные о значении рН цитозоля опухолевых клеток *in vivo* дополнены подробным морфологическим анализом, а также анализом гипоксии в опухоли. Продemonстрировано наличие в пределах опухоли зон клеток с разными значениями рН цитозоля. Данные полученные *in vivo* хорошо согласуются с результатами исследований *ex vivo*, полученными при анализе криосрезов опухолей.

Таким образом, первый этап исследований показал возможность использования нового генетически кодируемого сенсора SypHer2 для изучения рН цитозоля опухолевых клеток и корректность предложенных методик для анализа рН в разных модельных системах.

В следующем подразделе этой главы автором был проведен анализ динамики рН цитозоля опухолевых клеток при различных воздействиях. Так, в системе *in vitro*

были показаны изменения внутриклеточного pH как опухолевых, так и стромальных клеток (фибробластов) при их взаимодействии. Особый интерес для современной онкологии представляет изучение pH цитозоля опухолевых клеток при воздействии химиотерапии. В настоящее время в плане совершенствования химиотерапии наряду с поиском новых противоопухолевых препаратов идет поиск наиболее эффективных комбинаций уже используемых агентов, а также изучаются возможности комбинирования химиотерапевтического воздействия с другими способами лечения. В качестве одного из возможных способов совершенствования химиотерапии в настоящее время рассматривают модулирующее воздействие на pH внутриклеточной среды в опухолевой клетке и микроокружении, что и обуславливает практическую значимость полученных данных, представленных в данном разделе работы.

Автором представлены результаты трудоемких экспериментов по регистрации и анализу pH цитозоля опухолевых клеток при воздействии двух химиотерапевтических препаратов с разными механизмами действия (цисплатина и таксола). Для обоих препаратов показаны различия в изменениях pH цитозоля в погибающих и выживающих опухолевых клетках. При этом, pH различались не только для двух групп клеток, но и для препаратов, что позволяет сделать вывод о необходимости разных способов модификации pH цитозоля опухолевых клеток при использовании разных препаратов. Так, исходя из полученных автором данных, закисление цитоплазмы опухолевых клеток, ассоциировано с повышением эффективности лечения цисплатином, в то же время оно негативно отражается на результате обработки клеток таксолом.

Автором показана возможность мониторинга pH цитозоля опухолевых клеток *in vivo* в ходе лечения экспериментальных животных, при этом полученные результаты согласуются с данными, полученными *in vitro*, что свидетельствует о достоверности данных, полученных с использованием предлагаемых методов.

Заключение отражают весь ход проведения исследования, выводы диссертации четко сформулированы и отвечают поставленным задачам.

Диссертация написана понятным языком, используемая автором терминология общепринята, работа построена логично и хорошо структурирована. Все это свидетельствует о высокой профессиональной компетентности автора.

Замечания по диссертационной работе

В работе Дружковой И.Н. имеются некоторые незначительные недостатки:

1. В работе есть некоторые недостатки форматирования, опечатки и стилистически некорректные выражения. Так, автор использует нестандартное для диссертационных работ форматирование таблиц, «Генетически-кодируемы́й сенсор» – вместо «Генетически-кодируемый сенсор», «*chtlytt* ± SD» – вместо «среднее ± SD». Автор достаточно часто использует оборот «при помощи» в отношении методики/оборудования, в то время как этот оборот используется в русском языке в отношении одушевленных лиц, правильнее было бы использовать оборот «с помощью». И наконец, автор не всегда адекватно использует слова «отличие» (признак, создающий разницу, различие между данным лицом, предметом и другими лицами, предметами) и «различие» (несовпадение признаков и свойств каких-либо сравниваемых объектов).

2. В работе встречаются неудачные выражения, например, «трансфецированных сенсором», в то время как трансфекцию проводят не сенсорами, а плазмидной ДНК, содержащей трансген белка-сенсора.

3. Было бы желательно в диссертации привести структуру вектора, содержащего трансген белка-сенсора, который был использован для трансфекции опухолевых клеток.

4. В списке сокращений не приведены «CO» и «SD», которые использованы в тексте для обозначения стандартного отклонения значения показателя.

Указанные замечания не снижают достоверности, новизны и научно-практической значимости полученных Дружковой И.Н. результатов и не влияют на общую однозначно положительную оценку диссертационной работы.

Заключение

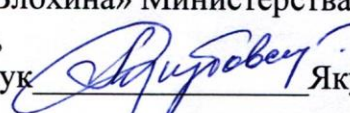
Диссертационная работа Дружковой Ирины Николаевны «Флуоресцентный имиджинг с генетически кодируемым сенсором SypHer2 в исследовании pH цитозоля опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи по обеспечению визуализации изменения pH цитозоля опухолевой клетки в зависимости от условий микроокружения. Это решение имеет большое научно-практическое значение как для

проведения дальнейших фундаментальных исследований процессов жизнедеятельности в опухолевой клетке с применением биофизических и молекулярно-биологических методов, так и для совершенствования химиотерапии злокачественных новообразований. Диссертационное исследование выполнено на высоком экспериментальном и теоретическом уровне и вносит существенный вклад в фундаментальные знания по биологии опухолевой клетки.

Тема диссертационной работы соответствует паспорту специальности 1.5.2 — биофизика. Актуальность работы, объем полученных данных, новизна, уровень проведенных исследований, фундаментальная и практическая значимость результатов отвечают требованиям пунктов 9-14 «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.

заведующая отделом химического канцерогенеза
НИИ канцерогенеза

Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский центр
онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения
Российской Федерации,

доктор медицинских наук  Якубовская Марианна Геннадиевна

Россия, 115478, г.Москва, Каширское шоссе, д. 24,

Телефон: +7 (925) 6761167

Дата: 7 сентября 2021 г.

Подпись Якубовской М.Г.заверяю:

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский центр
онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения
Российской Федерации,

кандидат биологических наук



Кубасова Ирина Юрьевна