

ОТЗЫВ

**официального оппонента кандидата физико-математических наук,
доцента по специальности Булгаковой Наталья Николаевны на
диссертацию Шилягиной Натальи Юрьевны «Исследование
тетраарилтетрацианопорфиразинов в качестве потенциальных
фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии и
флуоресцентной диагностики», представленной на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.02 – «Биофизика»**

Актуальность темы диссертации

В последнее десятилетие в практику отечественного здравоохранения были внедрены новые лазерные медицинские технологии, основанные на использовании фотосенсибилизаторов. В первую очередь, это относится к методу фотодинамической терапии (ФДТ). В основе данного метода – катализируемое светом разрушение фотосенсибилизированных тканей в присутствии кислорода. В России ФДТ широко применяется в клинической практике и представляет несомненный интерес для практикующих врачей, и, прежде всего, для онкологов. В тоже время, наблюдается серьёзное отставание фундаментальных исследований в области фотодинамического воздействия на биологические объекты и поиска новых эффективных фотосенсибилизирующих агентов

В связи с вышесказанным, диссертационное исследование Шилягиной Н. Ю. представляется актуальным и своевременным.

Научная новизна и практическая значимость работы

Автором проведено исследование новых соединений, тетраарилтетрацианопорфиразинов, и показано характерное для данных

соединений сочетание свойств фотосенсибилизатора и флуоресцентного молекулярного ротора. В работе впервые изучено распределение данных фотосенсибилизаторов в опухолевых клетках *in vitro* и показано их накопление в околоядерной области и ядерной мембране,

На экспериментальной опухолевой модели *in vivo* автором получены доказательства повышенного накопления тетраарилтетрацианопорфиразинов в тканях опухоли относительно окружающих нормальных тканей при системном введении фотосенсибилизаторов в составе наночастиц на основе полимерных щеток.

Тот факт, что данные соединения сочетают свойства фотосенсибилизаторов и флуоресцентных молекулярных роторов, представляет несомненный интерес для получения новых фундаментальных знаний о механизмах внутриклеточных процессов при фотодинамическом воздействии.

Автором разработана установка для создания равномерного светового потока в 96-луночных планшетах с возможностью независимого светового воздействия на индивидуальные группы лунок при высокой стабильности световой мощности в процессе работы и прецизионном контроле температурного режима во время проведения исследований. С помощью данной установки автором реализован методический подход к оценке фотодинамического эффекта на клеточных культурах *in vitro*. Этот подход может иметь практическое значение, поскольку позволяет осуществлять скрининг новых препаратов - потенциальных фотосенсибилизаторов.

По результатам проведенного исследования опубликовано 4 печатные работы в центральных рецензируемых журналах. Результаты исследования доложены и обсуждены на 21 отечественных и международных конгрессах, съездах и конференциях молодых ученых. Публикации и автореферат полностью отражают содержание диссертации.

Обоснованность и достоверность научных положений, рекомендаций и выводов

Достоверность представленных в диссертационной работе материалов несомненна. Это подтверждается, прежде всего, воспроизводимостью экспериментальных данных, надежностью использованных экспериментальных методов исследования, а также качественной и количественной согласованностью с результатами независимых исследований других авторов.

Содержание работы

Диссертация написана в традиционном стиле, построена по общепринятому принципу. Работа состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), описания материалов и методов исследования (Глава 2), результатов собственных исследований и их обсуждения (Глава 3), заключения, выводов и списка литературы. Список литературы имеет внушительные размеры: он содержит 270 источников, из них 216 зарубежных.

Как обзор литературы, так и изложение результатов исследований представлено грамотно, корректно, четко. Выводы обоснованы, соответствуют поставленным задачам и вытекают из результатов проведенных исследований. Следует отметить весомое количество иллюстративного материала: диссертация содержит 7 таблиц и 45 рисунков.

Во **Введении** диссертант дает обоснование актуальности исследуемой проблемы, формулирует цель и задачи исследования. Также введение содержит оценку научной новизны и практической значимости результатов исследования. Положения, выносимые на защиту, изложенные в данном разделе работы, отражают суть исследования и полученные результаты.

В **Главе 1** представлен обзор современных публикаций отечественных и зарубежных исследователей, освещается история развития и базовые принципы фотодинамической терапии рака. Автор описывает свойства

современных фотосенсибилизаторов, разрешенных к клиническому применению для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики рака, рассматривает механизмы их внутриклеточного и тканевого распределения. В последней части обзора автор вводит понятие флуоресцентного «молекулярного ротора», подробно описывает фотофизические свойства данных соединений, обсуждает возможность их применения для оценки локальной вязкости среды.

Глава 2 представляет подробное описание материалов и методов исследования. Прежде всего, необходимо отметить очень широкий спектр используемых в работе методов исследования. Помимо классических оптических методов (спектроскопия поглощения и флуоресцентная спектроскопия), автор использовал такие современные методы исследования как лазерная сканирующая микроскопия, время-разрешенная микроскопия, конфокальная микроскопия, поверхностный флуоресцентный имиджинг.

В Главе 3 изучены фотофизические свойства исследуемых соединений: описаны спектры поглощения и флуоресценции двух тетраарилтетрацианопорфиразинов, их иттербиевых комплексов, а также полимерных наночастиц, допированных молекулами указанных выше соединений; определены квантовые выходы и времена жизни возбужденных состояний флуоресценции исследуемых соединений в зависимости от свойств среды. На основании полученных данных диссертант выдвинул и подтвердил предположение о принадлежности тетраарилтетрацианопорфиразинов к классу флуоресцентных молекулярных роторов.

Следующим этапом работы было изучение динамики накопления и внутриклеточной локализации тетраарилтетрацианопорфиразинов в опухолевых клетках *in vitro*, которое выявило накопление фотосенсибилизатора в ядерной мембране и околоядерной области. Следуя логике проводимого исследования, диссертант провел анализ фотодинамической активности исследуемых соединений на опухолевых клетках *in vitro* и выделил наиболее эффективные. На данном этапе работы

диссертант также выдвинул и экспериментально подтвердил гипотезу о возможности использования «роторных» свойств фотосенсибилизатора для мониторинга вызванных световым воздействием изменений локальной вязкости среды, в которой находится флуорофор.

Заключительная часть посвящена изучению кинетики накопления тетраарилтетрацианопорфиразинов в экспериментальной опухоли на лабораторных животных *in vivo*. Результаты показали длительное удержание фотосенсибилизатора в опухолевых тканях относительно окружающих нормальных после внутривенного (системного) введения в составе наночастиц на основе полимерных щеток.

Заключение диссертации представляет собой краткое последовательное изложение сущности проведенного исследования и полученных результатов. Выводы отвечают поставленным задачам и позволяют подвести обоснованный итог проведенного исследования.

Общие замечания

Принципиальные замечания по научному содержанию и оформлению работы отсутствуют. Помимо необычного для диссертационных работ широкого спектра современных оптических методов исследования, достоинством данной работы, несомненно, является профессиональный стиль изложения. Работа написана грамотно, литературным языком, материал изложен последовательно, с соблюдением внутренней логической взаимосвязи между разделами.

В тоже время, необходимо сделать следующие замечания.

1. К сожалению, в обзоре литературы отсутствуют цитирования работ пионера отечественных разработок в области ФДТ профессора В. В. Соколова, чьи результаты по фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностике ранних форм рака имеют мировое признание.

2. В Главе 1 со ссылкой клинические обзоры есть несколько ошибочных утверждений. Например, тиражируется ошибочное утверждение о том, что «способность гематопорфирина к избирательному накоплению в опухоли была показана в 1924 г. А. Поликардом» (стр. 13, ссылка [9]). На стр. 31 автор цитирует отечественные обзоры 2008 и 2010 [ссылки 32, 46]: «Анализ данных при применении ФДТ с ФС первого и второго поколений позволили сформулировать основные требования, предъявляемые к «идеальному» фотосенсибилизатору:». Все перечисленные в тексте требования, как и понятие «идеального» фотосенсибилизатора были впервые сформулированы в 1989 в работе MacRobert A.J., et al “What are the ideal photoproperties for a sensitizer?” по результатам первых клинических испытаний метода ФДТ с фотосенсибилизатором первого поколения (In: Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use, Ciba Foundation Symposium 146, 1989, P. 4-16).
3. На стр. 27 автор пишет «ПП-IX является достаточно активным ФС вследствие наличия интенсивной полосы поглощения с максимумом на длине волны 630 нм.....». Общеизвестно, что протопорфирин IX, как все порфирины, имеет слабое поглощение в области 630 нм и, во-вторых, сомнительным с научной точки зрения является словосочетание «достаточно активный ФС».
4. В Главе 2 на стр. 48 указано общее количество экспериментальных животных, однако, количество животных в контрольной и опытных группах, а также определение опытных групп не указано.
5. В Главе 2 на стр. 56 кратко указаны параметры возбуждения и регистрации экзогенного флуоресцентного излучения при исследовании кинетики накопления фотосенсибилизаторов в экспериментах *in vivo* методом поверхностного флуоресцентного имиджинга. При этом не указаны тип источника и плотность мощности возбуждающего излучения. Также отсутствует информация о нормировке

флуоресцентных сигналов, которая является наиболее принципиальной и важной процедурой при оценке флуоресцентных сигналов *in vivo*.

6. По данным конфокальной микроскопии диссертант оценивает отношение экзогенного флуоресцентного сигнала в опухоли к таковому в окружающих нормальных тканях как 4:3 и делает вывод (стр. 104) о высокой селективности накопления фотосенсибилизатора в опухоли. Необходимо отметить, что такая флуоресцентная контрастность опухоль-норма, согласно данным мировой и отечественной литературы, не рассматривается как доказательство высокой селективности накопления.
7. С моей точки зрения, было бы целесообразно заканчивать каждый раздел Главы 3 небольшим резюме, подытоживающим в краткой и сжатой форме полученные результаты.
8. В списке литературы на стр. 105 неправильно указаны авторы публикации [3].

Однако, сделанные замечания не умаляют значение данной работы и не снижают общей положительной оценки.

Заключение

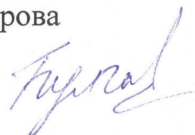
Диссертационная работа Шилягиной Натальи Юрьевны «Исследование тетраарилтетрацианопорфиразинов в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика», является самостоятельно выполненной завершенной квалификационной работой.

По своей актуальности, научной новизне и практической значимости, диссертационная работа Шилягиной Н. Ю. полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой

степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает искомой степени по специальности 03.01.02 – «Биофизика»

Официальный оппонент:

Кандидат физико-математических наук,
доцент по специальности, руководитель
Научно-образовательного Центра
Института общей физики им. А.М. Прохорова
Российской Академии Наук



Н.Н. Булгакова

Подпись Н.Н. Булгаковой ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь

Института общей физики им. А.М. Прохорова

Российской Академии Наук

доктор физ.-мат. наук



С.Н. Андреев

01 декабря 2014 г. Москва

Булгакова Наталья Николаевна
119991 Москва, ул. Вавилова, 38,
e-mail: nbulgakova@nsc.gpi.ru
Телефон: +7(499)1351492