

В диссертационный совет ПДС 0300.025
при Федеральном государственном автономном
образовательном учреждении высшего образования
«Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы»
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

ОТЗЫВ

Официального оппонента, д.б.н., ведущего научного сотрудника лаборатории
клеточной биологии и молекулярной медицины ФГБУ Национальный
исследовательский центр "Курчатовский институт"

Посыпановой Галины Ароновны

на диссертационную работу Петровой Альбины Сергеевны

**"Механизмы гибели опухолевых клеток при фотоактивации новых
производных хлорина",**

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальностям: 1.5.4 – «Биохимия» и 3.1.6 –
«Онкология, лучевая терапия».

Актуальность темы исследования.

Фотодинамическая терапия, как один из методов лечения злокачественных опухолей, основана на введении в организм специальных веществ – фотосенсибилизаторов (ФС), способных накапливаться в опухолевой ткани, с последующим локальным световым облучением очага поражения. Активация ФС световым воздействием приводит к образованию активных форм кислорода и свободных радикалов, обладающих высоким цитотоксическим и цитостатическим потенциалом. Однако, несмотря на перспективность данного вида химиотерапии, ФДТ не лишена ряда существенных недостатков, в частности, развития побочных эффектов за счет поглощения ФС здоровыми тканями.

Наиболее известным из ФС являются хлорины. Максимум поглощения у них составляет 660 нм, что соответствует области оптической прозрачности для биологических тканей. Хлорины обладают высокой фотодинамической активностью, высоким квантовым выходом синглетного кислорода при малой энергии активации при невысоких дозах введения. Кроме того, в этих соединениях имеются доступные для модификации группы, модификация которых в ряде случаев усиливает специфическую активность ФС. В частности, включение в состав ФС бора позволяет использовать такие соединения для бор-нейтронозахватной терапии, очень перспективному направлению в радиотерапии опухолей. Таким образом, диссертационное

исследование Альбины Сергеевны Петровой, посвященное исследованию биологической активности нового производного хлорина – фторборхлорина (ФБХ) и изучению механизмов гибели опухолевых клеток, безусловно, является актуальным и востребованным.

Новизна исследования и полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Полученные в ходе диссертационного исследования А.С. Петровой результаты обладают безусловной новизной. Впервые проведена оценка цитотоксичности и фотодинамической активности нового производного хлорина – ФБХ. Впервые изучена темновая токсичность и внутриклеточное накопление фторборхлорина, проведено сравнение по указанным параметрам с другими производными хлорина: фторхлорином и борхлорином. Показано, что ФБХ обладает низкой темновой токсичностью *in vitro* для клеток опухолевых линий, продемонстрирована высокая фототоксичность ФБХ. Установлено, что фотоактивация ФБХ вызывает гибель как чувствительных, так и резистентных опухолевых клеток с лекарственной устойчивостью, обусловленной антиоксидантной защитой, путем фотонекроза. Обнаружено, что формирование резистентности клеток SKOV-3 к цисплатину связано с развитием адаптивного антиоксидантного ответа. В экспериментах на животных показана высокая терапевтическая активность ФБХ. Впервые установлены режимы (доза лекарственной формы ФБХ, параметры освещения и нейтронного пучка) для фотодинамического и бор-нейтронозахватного воздействий. Продемонстрирована эффективность использования ФБХ как нового фоторадиосенсибилизатора при сочетанном действии ФДТ и бор-нейтронозахватной терапии на модели меланомы мыши В16. Водорастворимая лекарственная форма ФБХ обладала мощным противоопухолевым действием при сочетании фотоактивации и нейтронного облучения. Сочетание ФДТ и облучения приводило к регрессии меланомы мыши В16 и радикальному снижению количества метастазов в легких и лимфоузлах.

Значимость/ценность для науки и практики полученных результатов

В работе А.С. Петровой впервые проведена оценка цитотоксичности и фотодинамической активности нового производного хлорина, синтезированного в ИНЭОС РАН. Экспериментально доказана высокая противоопухолевая эффективность фторборхлорида как в отношении культуры опухолевых клеток, так и при терапии экспериментальных

опухолей мышей. Результаты диссертационного исследования А.С. Петровой *in vitro* и *in vivo* позволяют оценить перспективность применения фторборхлорида для терапии опухолей и рекомендовать этот препарат для проведения доклинических исследований.

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

Основные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе А.С. Петровой, научно обоснованы, закономерно следуют из результатов, базируются на достаточном экспериментальном материале. Работа выполнена на хорошем методическом уровне с использованием современных методов. Достоверность результатов, благодаря использованному арсеналу методов, соблюдению требований статистики при проведении экспериментов не вызывает сомнений. Статистическая обработка результатов проведена корректно и позволяет в полной мере обосновать выводы диссертации и положения, выносимые на защиту.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты диссертации отражены в 11 публикациях в журналах и сборниках конференций, из них 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. А.С. Петрова является автором патента, оформленного с использованием результатов диссертационного исследования.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, предъявляемыми к авторефератам, дает полное представление об основных положениях диссертации и соответствует ее содержанию.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа А.С. Петровой построена по классическому принципу и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, описание результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы, и список цитируемой литературы, содержащий 181 источник, благодарности. Диссертация изложена на 100 страницах печатного текста, иллюстрирована 26 рисунками и содержит 3 таблицы.

Введение посвящено обоснованию актуальности исследования, изложены цель и задачи работы, новизна и практическая значимость. С моей точки зрения, цель работы "исследовать механизм гибели опухолевых клеток при фотоактивации новых производных хлоринов" сформулирована не очень удачно, так как определению механизма гибели посвящена только часть экспериментальной работы, вошедшей в диссертационное исследование. Но формально задачи соответствуют поставленной цели, положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно.

Обзор литературы представлен тремя разделами. В первом разделе автор рассматривает вопросы, касающиеся роли оксидативного стресса и редокс-зависимой регуляции в жизнедеятельности клетки. Проведен анализ редокс-зависимых ферментных систем, проанализирована роль АФК в окислении липидов, белков, нуклеиновых кислот при оксидативном стрессе. Во втором разделе автор рассматривает основные принципы ФДТ, описывает принцип активации химических соединений-фотосенсибилизаторов, развитие оксидативного стресса, характеризует различные ФС, их достоинства и недостатки, рассматривает возможные при ФДТ типы программируемой клеточной гибели. Обзор литературы охватывает современные сведения по изучаемым вопросам, вводит читателя в круг анализируемых автором проблем. Обзор написан русским языком, читается с большим интересом, хотя местами, из-за несогласований слов в предложениях и неудачного перевода с английского языка, смысл угадывается с трудом. Например, смысл фразы "активация антиклеточной гибели членов семейства Bcl-2" (стр. 13) от меня ускользнул.

В главе "Материалы и методы" очень подробно и наглядно описаны все использованные автором материалы и весь арсенал использованных в работе методов. Все использованные методы полностью адекватны поставленным задачам.

Собственные результаты автора и их обсуждение изложены в соответствующей главе. С помощью метода ОТ-ПЦР был определен уровень экспрессии генов, контролирующих редокс статус клеток линии SKOV-3 и резистентной сублинии SKOV-3/CDDP. Оценено в динамике накопление в клетках трех производных хлорина: ФБХ, БХ и ФХ. Изучены темновая и фототоксичность ФБХ для 7 линий опухолевых клеток и для контрольных клеток (фибробласты человека). Изучение механизмов гибели клеток в результате ФДТ подтвердило, что гибель клеток происходит в результате некроза. Очень обнадеживающие результаты были получены А.С. Петровой в экспериментах *in vivo*. Убедительно продемонстрирована

противоопухолевая активность ФБХ при фотоактивации и, особенно, при фотоактивации в сочетании с нейтронным облучением.

В "Заключении" автор подводит итоги исследования, обобщая полученные результаты. Все 5 выводов диссертационной работы логично вытекают из полученных данных, адекватны и полностью обоснованы.

Замечания по работе.

1. В оглавлении отсутствует раздел 1 (и подразделы, соответственно) в Главе 1
2. Стр. 34. Речь идет о синтетических хлоринах. "за счет смещения λ_{\max} в инфракрасную область спектра ($\lambda_{\max} = 660$ нм)". Инфракрасная область – $\lambda > 780$ нм.
3. Неясно, почему в одних случаях клетки облучали белым светом, а в других красным?
4. Стр. 56. Облучение клеток и мышей в нейтронном реакторе. Что за реактор, какая энергия нейтронов, какая доля гамма-квантов?
5. На микрофотографиях (рисунки 12-14) не приведены масштабные отрезки.
6. Вызывают некоторые вопросы данные, полученные с помощью проточной цитометрии. На рис. 16 для РІ использовали фильтр для РЕ, а на рис. 18 – PerCP-Cy5-5. Не очень понятно, почему для РІ выбран данный фильтр. На том же рисунке 18 на гистограммах отмечено АРО, хотя это явно некротические клетки.
7. Почему ФБХ вводили внутрибрюшинно, а не внутривенно?
8. Стр. 76-77 (БЗТ клеток В16). Рис. 25. Странно, что при облучении нейтронами клеток линии В16 в дозе 2 Гр, через 24 ч клетки практически не погибали. С чем это может быть связано?
9. Стр. 78, рис. 26. На рисунке нет регрессии опухоли на 7 сут после ФДТ. В то время как на стр. 74 при описании разных режимов облучения во всех вариантах наблюдалась полная регрессия опухоли на 7 сут у 78-100% животных.

Следует подчеркнуть, что замечания носят лишь частный характер и ни в коем случае не снижают ценность полученных результатов и не ставят под сомнение научную значимость исследования.

Заключение.

Диссертационное исследование Петровой Альбины Сергеевны является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи по исследованию механизмов действия и противоопухолевой эффективности новых фотосенсибилизаторов, имеющей

важное значение для развития современной биохимии и экспериментальной онкологии. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, согласно п.2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», утвержденного Ученым советом РУДН, протокол № 12 от 23.09.2019г., а её автор Петрова Альбина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.4 – Биохимия и 3.1.6 – Онкология, лучевая терапия.

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины ФГБУ "Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", д.б.н. по специальности 03.01.04 – биохимия

123182, Российская Федерация, г. Москва, площадь Академика Курчатова, 1.

Телефон: +7(499)196-7100, доб. 6683

Электронная почта: galinapo@gmail.com



Посыпанова Г.А.

Подпись Посыпановой Г.А. заверяю:

Главный ученый секретарь НИИ
"Курчатовский институт"



Борисов К.Е.