

ОТЗЫВ

**официального оппонента Пащенко Владимира Захаровича на
диссертационную работу Ишемгулова Азамата Талгатовича “Длительная
люминесценция молекул сенсibilизаторов в тканях при
фотодинамическом действии”, представленной на соискание ученой
степени кандидата физико-математических наук по специальности
01.04.05 – Оптика**

Целью диссертационной работы Ишемгулова А.Т. являлось определение эффективности различных каналов релаксации триплетных состояний молекул фотосенсибилизаторов (ФС) в здоровых тканях и тканях со злокачественной патологией. Каналами дезактивации Т-состояний ФС являются фосфоресценция, замедленная флуоресценция, генерация синглетного кислорода, Т – Т аннигиляция и аннигиляция Т-состояния ФС и синглетного состояния кислорода. Последний канал дезактивации Т-состояния на временных интервалах 1 – 10 мкс превосходит по эффективности все другие пути, легко регистрируется, его вклад сильно зависит от свойств окружающей среды, концентрации кислорода, способа возбуждения. Сосредоточив свое внимание на изучении этого компонента релаксации Т-состояний ФС, автор доказал его информативность и специфическую зависимость интенсивности сигнала от различных параметров среды и условий возбуждения, что позволило ему предложить, например, метод оптического мониторинга содержания кислорода в тканях, а также метод оценки эффективности фотодинамического действия на злокачественные новообразования.

Следовательно, данная диссертационное исследование является фундаментальным и имеет ярко выраженное прикладное направление. Его актуальность очевидна.

Диссертация написана на 149 страницах печатного текста, содержит 36 рисунков и 7 таблиц, а также 158 ссылок на литературные источники. По структуре диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической части, двух экспериментальных глав и выводов.

Введение написано по традиционной схеме, в нем обоснована актуальность темы исследования, показаны новизна и практическая значимость работы,

сформулированы цели и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы изложен на 34 страницах и содержит все необходимые для выполнения работы сведения. Так, в обзоре кратко описана физическая природа процессов, приводящих к возникновению замедленной флуоресценции (ЗФ) в молекулах красителей (зондов), а также принципы оптической медицинской диагностики. Так как флуоресцентная диагностика используется, в основном, в фотодинамической терапии, в обзоре литературы приведены необходимые сведения по процессам генерации синглетного кислорода в биологических тканях, а также по механизмам тушения синглетного кислорода (СК). Завершается обзор описанием методик наблюдения за эволюцией СК в живых тканях.

Во второй главе автор диссертации описал методы и объекты исследования, использованные для выполнения работы. Все основные эксперименты были выполнены на оригинальной автоматизированной установке для стационарной и динамической флуорометрии, построенной в месте выполнения работы. С ностальгией по ушедшей молодости я узнал, что связь аналоговых измерительных устройств и цифровых систем обработки данных осуществлялась на основе магистрально-модульной системы стандарта КАМАК. Работа на таком стенде требует знаний в области электроники, написании программ управления и обработки данных и очень затратна по времени. С одной стороны, можно сделать заключение о хорошей подготовке Ишемгулова А.Т. как физика-экспериментатора. С другой стороны, хочется дать совет обновить компоненты установки, чтобы улучшить временное разрешение и реализовать возможность регистрировать трехмерные картинки по λ , t , и I (интенсивность сигнала). Это сразу переведет ваш стенд в разряд современных комплексов для спектрально-кинетических исследований.

В этой же главе описаны материалы и объекты исследования, среди которых ткани молочной железы, легкого, печени и почек лабораторных мышей. В качестве фотосенсибилизатора автор использовал ксантеновые красители эритрозин, эозин и бенгальский розовый. Выбор этих красителей вполне оправдан, т.к. они хорошо растворяются в воде, способны проникать

внутри клеток, имеют высокий квантовый выход в триплетное состояние и не обладают токсичностью.

В третьей главе диссертации автор привел многочисленные доказательства того, что определяющий вклад в кинетику ЗФ на временах 1 – 10 мкс вносит синглет-триплетная аннигиляция Т-состояний красителя и СК (АЗФ). Для этого был выполнен анализ вкладов от различных механизмов реализации ЗФ. Оказывается, что на коротких временах АЗФ по интенсивности существенно превышает фосфоресцентное свечение, а также термоактивированную ЗФ. На временах >10 мкс АЗФ исчезает и кинетика ЗФ формируется за счет ТЗФ и ФФ. При понижении концентрации кислорода в ткани сигнал АЗФ уменьшается, что свидетельствует об аннигиляционном характере этого компонента ЗФ. Такая прямая зависимость интенсивности АЗФ от концентрации O_2 в тканях навела автора на мысль о возможности оптического мониторинга кислорода в образце. Эта идея была реализована в диссертации в виде предложенного автором метода непрерывного контроля содержания кислорода в тканях *in vivo*. Подчеркну, что эффективность фотодинамической терапии как раз и определяется наличием кислорода в среде, синглетная форма которого способна поражать опухолевые клетки. Поэтому контроль содержания O_2 в облучаемой ткани является весьма насущной задачей, которая не решена до настоящего времени.

В четвертой главе детально исследовано световое тушение замедленной флуоресценции (СТЗФ). Для этого здоровые и опухолевые ткани возбуждались серией лазерных импульсов наносекундной длительности, следующих с различной скважностью. Суть экспериментов состояла в том, что образующийся в тканях синглетный кислород расходуется по двум каналам – в процессе $T_1 + {}^1O_2$ аннигиляции, а также в фотодинамических реакциях разрушения опухоли, для чего, собственно, и придуман метод ФДТ. При этом, в фотодинамических реакциях кислород расходуется необратимо. Ясно, что если освещать ткань цугом импульсов, период следования которых больше времени восстановления O_2 , то после каждого импульса содержание кислорода будет уменьшаться, а амплитуда АЗФ уменьшаться. Этот подход позволил определить время восстановления исходной концентрации O_2 после

окончания импульсного возбуждения ФС как *in vitro*, так и *in vivo*. Таким образом, автором работы получен крайне важный результат исследования, основываясь на котором можно существенно оптимизировать метод ФДТ, введя контроль эффективной дозы облучения в реальном времени.

Автор не ограничился экспериментальным исследованием СТЗФ, а предложил кинетическую модель фотосенсибилизации и химического расходования СК, учитывающую диффузию молекул O_2 к неподвижным Т-центрам. Эта модель описывается относительно простой системой уравнений, однако решить аналитически эту систему крайне трудно. Необходимо вводить ряд начальных условий и допущений, в частности, для того, чтобы разделить диффузионные и кинетические процессы. Для удовлетворительного описания экспериментальных данных автору пришлось предположить, что в процессе связывания молекул ФС с субстратом часть зондов может быть экранирована от доступа O_2 . Такое допущение вполне разумно, так как в структуре белков существуют области, недоступные для кислорода. Вместе с тем, если измерить кинетику АЗФ со значительно большим временным разрешением, позволяющим регистрировать “полную кинетику”, то, по всей видимости, из этой кинетики относительно легко можно будет определить коэффициенты диффузии молекул O_2 .

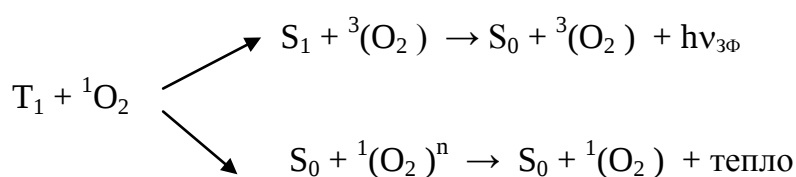
В своем отзыве я отметил основные достижения Ишемгулова А.Т., которых вполне достаточно для защиты диссертации. Кроме этих результатов, автором получены также сопутствующие данные, которые в значительной степени усиливают важность выполненного исследования.

Как и любая работа, оппонируемая диссертация не свободна от недостатков.

1. Многочисленные замечания относятся к стилю изложения материала. Говоря об атмосферном давлении, автор использует такие выражения, как “на атмосфере”, “на воздухе”. Такой лабораторный сленг не годится для научной работы. Кроме того, связывание молекулы ФС с белком автор называет агрегацией, тогда как под агрегацией следует понимать образование ассоциатов молекул одного и того же типа, т.е. в данном случае образование ассоциатов молекул сенсибилизаторов. Не ясно, что имеет автор в виду под

флуорогенными свойствами ФС, стр. 78. Использование надписей на рисунках на английском языке в диссертациях, написанных на русском языке, считаю некорректным. Встречаются странно оформленные подписи к рисункам – вначале даются обозначения, затем название рисунка. На рис. 1.5, 4.3, 4.4 нет цвета, хотя в подписях к рисункам цвета указаны. Утеряна вставка к рис. 3.5, хотя она обсуждается в тексте. Схема переноса энергии $T_1 \rightarrow {}^3(O_2)$, рис. 1.6, не является резонансной. Нет также рис. 2b и 3b, где должны быть приведены кинетики безразмерной функции $B_1 n_{\Delta}(t)$. На рис. 3.8 нет надписи, относящейся к обозначению положения максимума спектра флуоресценции различных здоровых тканей. Наконец, скорость процесса (стр. 41) измеряется в обратных секундах.

2. Синглет-триплетная аннигиляция триплетных молекул ФС и 1O_2 может протекать по двум каналам:



В диссертации рассматривается только верхний путь с испусканием кванта замедленной флуоресценции. Никаких доказательств отсутствия нижнего пути реакции аннигиляции в диссертации я не нашел. Между тем, в данном канале могут реализоваться важные процессы – тушение T_1 при сохранении концентрации СК в среде.

3. В работе для возбуждения ФС использована вторая гармоника лазера на гранате с длиной волны 532 нм. Такое излучение не попадает в окно прозрачности живой ткани и может быть использована только в ФДТ поверхностных биотканей. В последний десяток лет для целей ФДТ активно используется ап-конверсионные наночастицы (UCNP), способные поглощать свет при 960 – 980 нм. В результате двухфотонного возбуждения такие UCNP флуоресцируют в зеленой (520 – 560 нм) и красной (650 – 670 нм) частях спектра и эффективно передают энергию молекулам ФС, поглощающим свет в

этих спектральных диапазонах. Хочу посоветовать Ишемгулову А.Т. использовать такие ап-конверсионные наночастицы в дальнейшей работе.

Указанные замечания не снижают высокого уровня представленной работы. Таким образом, диссертационная работа Ишемгулова А.Т. соответствует специальности 01.04.05 – Оптика и отрасли физико-математических наук, по которой она представлена к защите.

Считаю, что диссертация “Длительная люминесценция молекул сенсibilизаторов в тканях при фотодинамическом действии” удовлетворяет всем критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а ее автор Ишемгулов А.Т. заслуживает присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 – Оптика.

Пашенко Владимир Захарович

Профессор, доктор физико-математических наук

Заведующий сектором биофотоники

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

Биологический факультет, кафедра биофизики

119234, Россия, Москва, Ленинские Горы, дом 1, стр. 12

Тел.: 8 (495) 939-11-07, E-mail: vz.paschenko@gmail.com



В.З.