

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации Асташева Максима Евгеньевича на тему «НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ОПИСАНИЮ ДИНАМИКИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ, КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ И ТКАНЕЙ», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности

1.5.2. Биофизика

Актуальность темы исследования

Изучение биологического объекта как сложной системы предполагает, что его свойства невозможно постичь лишь на основании описания свойств и поведения отдельных ее частей, поскольку функционирование системы обеспечивается взаимодействием составляющих ее компонентов и динамикой биологической системы. Исследование функционирования сложной биологической системы во времени позволяет более точно описать те или иные процессы. Для этого зачастую прибегают к математическому моделированию динамики биологических процессов. Корректность модели, во многом, определяется полнотой описания изучаемого объекта. Даже если известен механизм протекания того или иного процесса, его исследование в динамике позволяет ответить на множество дополнительных вопросов, например, изменяется ли динамика исследуемого процесса при патологии или изменении внешних условий. Одним из подходов для изучения сложной биологической системы, состоящей из множества взаимодействующих элементов, является аналитика больших данных (концепция big data). Этот подход включает в себя получение больших объемов экспериментальных данных, а также адекватные методы их анализа. Успех этого подхода подтверждается тем фактом, что основное развитие в рамках системной биологии получили направления, где методически было обеспечено получение больших массивов данных, а также разработано специальное математическое обеспечение для их анализа. Тема диссертации Асташева М.Е. является актуальной, поскольку она направлена на поиск новых методических экспериментальных и теоретических подходов к исследованию объектов клеточной и мембранной биологии, физиологии растений, где применение концепций получения и анализа больших объемов данных развито слабо, но потенциально сулит получение новых знаний о внутренней структуре соответствующих биологических систем. В качестве объекта исследования Асташевым М.Е. выбрано четыре типа биологических объектов с различным уровнем организации: молекулярная машина белкового канала, популяции культивируемых клеток разного происхождения и ткани центральной нервной системы и растений. Такой выбор позволил автору выявить общие для всех объектов свойства передачи и трансформации сигналов, заключающиеся в синтезе гармоник и расширении спектра сигналов в состоянии стресса.

Структура и содержание диссертации

Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, главы результаты и обсуждение, заключения, выводов, списка литературы, а также списка сокращений и

обозначений, списка рисунков и таблиц. Имеется 532 ссылок на первоисточники. Работа изложена на 412 страницах, содержит 92 рисунка, 62 из которых представлены в цветном исполнении, и 17 таблиц. Оставляет приятное впечатление наличие сносок на публикации в соответствующих разделах текста и подписях к рисункам, это очень помогло при ознакомлении с объемной работой.

«Введение»

В этой главе содержится краткое описание выбранной автором проблемы, обоснование выбора темы диссертации, ее актуальность, степень разработанности проблемы, новизну, теоретическую и практическую значимость работы, постановку цели и задач исследования, положения, выносимые на защиту, личный вклад автора, обоснование достоверности результатов и их апробация. Введение исчерпывающе описывает проблематику работы и содержит все необходимое формальное описание диссертационной работы, в соответствии с требованием ГОСТ Р 7.0.11-2011.

Глава 1 «Обзор литературы»

В этой главе Асташевым М.Е. сделан обзор литературы современных представлений по исследованию природных ритмических процессов в молекулярных системах, отдельных клетках, популяциях клеток, тканях растений и животных, а также физиологических системах организма. Отдельно рассмотрены специфические осцилляции в водных растворах. Самые важные числовые параметры: частоты, периоды ритмов; полученные в обзоре работ, автор сконцентрировал в удобных информативных таблицах, что позволяет использовать этот материал в справочных целях. Кроме того, дан обзор современных работ по математическому анализу ритмических процессов с описанием используемых методов (различные варианты вейвлет-анализа), синхронизации сигналов (биспектральный анализ и анализ когерентности), математическому моделированию генераторов ритмических колебаний в биологических системах, природным механизмам частотной фильтрации сигналов.

Обзор литературы является тем базовым материалом, на который автор далее опирается при изложении материала в главах «Методы», «Результаты и обсуждение», «Обсуждение» и «Заключение», поэтому подбор направлений, выбранных автором в обзоре, выглядит вполне оправданным.

Глава 2 «Материалы и методы»

Описаны использованные материалы и протоколы подготовки клеточного материала, манипуляций с животными, методов регистрации токов через одиночные каналы, флуоресцентной регистрации цитозольных концентраций кальция и оксида азота со светодиодным осветителем, регистрации полевых потенциалов мозга у животных, методы получения наночастиц селена.

Часть экспериментального и математического обеспечения перенесена автором в раздел «Результаты и обсуждение», видимо, для констатации авторского приоритета в этой части методических разработок.

Глава 3 «Результаты и обсуждение»

Глава содержит 6 разделов, соответствующих поставленным задачам. Раздел 3.1 посвящен разработке оборудования для регистрации временных рядов. Автор

очень подробно описал разработанные им приборы, включая электрические и оптические схемы, перечни используемых деталей. Представленные автором описания модификации микроскопа для флуоресцентных измерений, импульсного флуориметра для исследования фотосинтетических пигментов и импедансометрической приставки для исследования состояния ветвей растений выглядят вполне достаточными для повторения этих решений, что вносит существенный вклад в практическую ценность работы.

Раздел 3.2 посвящен разработке математического обеспечения для анализа экспериментальных данных: методу распределения популяции клеток по динамике транзиентных сигналов и исследованию нелинейных процессов передачи сигнала с целью поиска приемника и передатчика в системах с сетевой организацией. Автоматическое разделение популяций клеток по колокализации флуоресцентных красителей давно используется в проточной цитометрии. Однако описанные автором математические методы позволяют перенести цитометрический подход на анализ динамики флуоресценции красителей, что позволяет автоматически анализировать клеточные популяции более объективно и с меньшими трудозатратами. Совмещение этих методов анализа данных, с применением доступных в настоящий момент флуоресцентных микроскопов, представляется перспективным направлением методического развития клеточной биологии. Это позволит изучать клеточные популяции, по численности сравнимые с используемыми в проточной цитометрии, что обеспечит высокую точность определения численности субпопуляций.

В разделе 3.3 исследована динамика воротного механизма ионного канала. Регистрация и анализ токов через одиночные каналы является уникальным достижением автора, поскольку в настоящий момент подобные исследования встречаются в литературе крайне редко, а учитывая реализованную автором возможность длительной регистрации ионных токов по 15 минут, примеров подобных экспериментов найти не удалось. Синхронными каналами регистрации в данном случае являлись последовательности работы активационного и инактивационного процесса. Успех данного экспериментального подхода, видимо, стал результатом удачи в подборе объекта исследований и условий регистрации. В данном разделе автор смог совместить экспериментальные исследования с имитационным математическим моделированием, реализуя системно-биологический подход. С помощью математической модели воротного механизма ионного канала, содержащей гидродинамическое описание движения молекул воды и ионов, автором были получены предсказания о зависимости максимальных показателей биспектра от трансмембранного потенциала. Затем, это предсказание вполне подтвердилось экспериментально.

В разделе 3.4 исследована синхронная динамика цитозольных концентраций сигнальных молекул в культивируемых клетках. При организации исследований в данном разделе, автор явно стремился, с одной стороны, уйти от электровозбудимых клеток, образование которыми сетевых структур передачи сигналов давно известно, а с другой стороны, охватить достаточно большие поля зрения при микроскопическом исследовании, чтобы компенсировать достаточно большие расстояния передачи межклеточных сигналов у неэлектровозбудимых клеток. Кроме того, охват больших полей позволил автору проанализировать действительно многоканальные записи, поскольку анализ динамики концентраций

двух внутриклеточных месенджеров для каждой наблюдаемой клетки дал для анализа десятки синхронизованных рядов данных.

В разделе 3.5 проведено исследование нелинейных параметров в физиологических сигналах растений. В данном разделе исследование выполнено при одноканальной регистрации флуоресцентного сигнала от пигментов фотосистемы II при нагрузке объекта внешним периодическим сигналом. Несмотря на практическую ценность полученных результатов, хочется верить, что в дальнейшем автор сможет преодолеть методические ограничения описанного в работе оборудования и представить результаты трансформации сигналов в растительных клетках по той же схеме, что и в случае, например, с исследованиями внутриклеточной сигнализации.

В последнем разделе 3.6 исследование синхронизации ритмов центральной системы в различных структурах при раздражении внешним световым стимулом и фармакологически, введением L-глутамата. Исследования ритмов в центральной системе выполнены по классической для данной нейробиологии схеме, с использованием стандартных частотных диапазонов тета-, гамма- и альфа-ритмов. Однако, анализ межритмовой фазовой синхронизации является оригинальной разработкой автора, основанной на вычислении вейвлет-когерентности. Это позволило автору показать расширение синхронизованной активности как по структурам, так и между ритмами после внешнего раздражения, а также эффект адаптации системы при длительном введении L-глутамата.

Анализ экспериментальной части главы 3 позволяет выделить универсальный подход автора к постановке экспериментов: получение длительных многоканальных записей (10^4 - 10^6 точек дискретизации или событий переключения канала) динамики параметров биологического объекта для описания широкого частотного диапазона, анализ синхронных явлений математическими методами, выявление внутренней организации связей между компонентами биологической системы.

Глава 4 «Обсуждение»

Представлено общее целостное обсуждение всех полученных автором результатов, а также сравнение их с данными, представленными в литературных источниках. И здесь очень пригодился весь набор тематик обзора литературы. Кроме того, в данном разделе автор обсуждает пути решения некоторых проблем, с которыми он встретился в работе, например, вычислительные затраты при цифровой обработке сигналов и оптимальный план анализа сигналов с целью получения максимальной информации о синхронизации, наличия гармоник. Автор в данной главе намечает дальнейшие направления исследований. Интересным является решение автора включить в эту главу также обоснование возможности диффузионного механизма передачи межклеточных синхронизирующих сигналов в клеточных популяциях.

Глава 5 «Заключение»

В главе подведен итог диссертационной работе и сформулирована гипотеза о расширении частотного диапазона сигналов биологических систем в состоянии стресса. Это, возможно, самый интересный результат данной работы, который автор не вынес в выводы, и, хотя, в настоящее время данных для полного его

подтверждения нет, можно надеяться, что автор в дальнейшей работе найдет силы и время для его подтверждения.

Выводы работы, представленные в данной главе, соответствуют поставленным задачам, обоснованы, логически вытекают из результатов работы и их обсуждения.

Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

Степень обоснованности научных положений, выводов, полученных соискателем, достоверность результатов

Научные положения и выводы, представленные в диссертации Асташева М.Е., логично вытекают из результатов, представленных в работе, достоверность результатов обеспечена необходимым статистическим анализом, а также надежностью применяемых методов и широкой апробацией результатов работы. Дизайн экспериментов соответствует принятым в биологических исследованиях правилам, включал необходимые независимые повторы и соответствующие контрольные измерения, что позволило проконтролировать воспроизводимость результатов.

Автор провел широкую апробацию результатов на многочисленных научных мероприятиях и опубликовал основные результаты работы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК. Высокие показатели цитируемости публикаций подтверждают высокий интерес научного сообщества к работам автора.

Научная новизна

Наиболее интересные новые результаты, полученные автором: 1) впервые был проведен анализ синхронизации в популяциях неэлектровозбудимых клеток с помощью биспектрального анализа, и было показано увеличение синхронизации колебаний цитозольных концентраций кальция и оксида азота в диапазоне эндотелиального ритма (0,001-0,01 Гц) при повышении температуры, этот результат добавляет новый способ мобилизации защитных ресурсов организма при системной реакции на воспаление; 2) в результате биспектрального анализа было выявлено, что некоторые группы спектральных компонент сигналов клеток, растений и тканей проявляют увеличение внутренней корреляции при стрессе или раздражении, этот результат открывает новые возможности для идентификации стрессовых состояний в биологии.

Теоретическая и практическая значимость

Разработанный автором математический метод оценки направления распространения сигнала в системе с сетевой организацией может быть полезен при анализе моделей в биологии, радиотехнике и акустике. Разработанное автором программное обеспечение для математического анализа синхронизации временных рядов может быть использовано в научных фундаментальных и прикладных исследованиях в различных областях биологии и физики. Разработанный и протестированный способ регистрации физиологических параметров клеточных популяций и растений с помощью микроскопической флуоресцентной многополосной системы и импульсного флуориметра может быть использован в агробиотехнологической практике, например, для диагностики

стрессоустойчивости растений и биомедицине для диагностики и лечения различных заболеваний.

Замечания и вопросы

1. В обзоре литературы присутствует подраздел 1.10.2 Осцилляции хемилюминесценции воды. Не понятно, какое отношение это направление имеет к тематике диссертации. В то же время, было бы уместным сделать короткий обзор современных методов исследования биологических объектов, способных предоставить достаточный объем данных для анализа динамических процессов, включая флуоресцентную микроскопию с временным разрешением в исследованиях клеточных популяций.

2. В работе представлены данные, основанные на анализе флуоресценции растения в круглосуточном режиме в нормальных и стрессовых условиях. Не ясно при этом, были ли выполнены контрольные измерения, чтобы учесть и исключить артефакты в виде внешних периодических помех (например, это могли бы быть измерения в аналогичном режиме на растворах или фантомах).

3. Автором обнаружены статистические отличия показателей биспектра у растений в нормальных и стрессовых условиях (рис. 16 в автореферате). В качестве объяснения полученных отличий написано, что «растения, находящиеся под воздействием стресса от засухи, модифицируют динамику флуоресцентного ответа хлорофилла». Хотелось бы получить комментарий о предполагаемых физиологических и/или фотохимических механизмах подобной реакции.

4. В разделе работы 3.4 Исследование ритмической активности на клеточном уровне указано, что экзогенный АТФ в дозе 10 мкМ вызывает генерацию кальциевых спайков в 35.2 % клеток в популяция гранулоцитов. Требуется уточнить, чем обоснован выбор дозы АТФ и проводились ли оценки клеточной активности при других дозах. Можно ли ожидать увеличение процента активных клеток при более высоких дозах? В том же разделе указано, что АТФ в 2 раза усиливает адгезионные свойства клеток. Однако ни в тексте диссертации, ни в автореферате не написано, на основании каких измерений сделано это заключение. Так же в работе не обоснован выбор наночастиц селена для воздействия на эндотелиальные клетки.

5. Обращает на себя внимание плохое качество некоторых иллюстраций в диссертации (например, рисунки 24, 26, 49, 50, 51, 55, 62, 77, 78, 85, 90). На некоторых рисунках подписи представлены на английском языке. В автореферате два рисунка (с. 19 и 20) пронумерованы номером 10, но отсутствует рисунок с номером 14. На с. 18 автореферата автор делает отсылку на рис. 10 при описании данных об изменении количества активных клеток с указанием ряда стимулов, которые, однако, не представлены на рисунке. В целом в тексте диссертации содержатся значительное количество опечаток и небрежности в оформлении в виде отсутствия пробелов между словами, отступов в абзацах и пр.

Высказанные замечания носят формальный характер, не влияют на главные теоретические и практические результаты диссертации и не уменьшают ценности работы Асташева М.Е.

Тел.: 8(831)4655672; e-mail: shirmanova_m@pimunn.net

СВЕДЕНИЯ ОБ ОФИЦИАЛЬНОМ ОППОНЕНТЕ

по диссертации _____ Асташева Максима Евгеньевича
(Ф.И.О. соискателя)

на тему: Новые подходы к описанию динамики молекулярных комплексов, клеточных популяций и тканей

на соискание ученой степени кандидата/доктора биологических наук по специальности 1.5.2. — Биофизика.

ФИО оппонента (полностью)	Ширманова Марина Вадимовна
Гражданство	РФ
Ученая степень (с указанием шифра специальности научных работников, по которой защищена диссертация)	Доктор биологических наук, 1.5.2. — Биофизика
Ученое звание	Нет
Место работы	
Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации
Наименование структурного подразделения	Научно-исследовательский институт экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий
Должность	Заместитель директора по науке
Почтовый адрес	603950, БОКС-470, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1
Официальный сайт	https://pimunn.ru/
Контактный телефон	+7 904 044-05-65
E-mail	shirmanova_m@pimunn.net
Дополнительные сведения	

Список основных публикаций за последние 5 лет по теме диссертации соискателя:

1. Measurement of Patient-Derived Glioblastoma Cell Response to Temozolomide Using Fluorescence Lifetime Imaging of NAD(P)H. / Yuzhakova DV, Sachkova DA, Shirmanova MV, [et al.] // Pharmaceuticals (Basel). 2023. – Vol. 16, No. 6. – P.796. – doi: 10.3390/ph16060796. – EDN HBEKML.
2. Monitoring the Intracellular pH and Metabolic State of Cancer Cells in Response to Chemotherapy Using a Combination of Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy / I. Druzhkova, A. Komarova, E. Nikonova [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25, No. 1. – P. 49. – DOI 10.3390/ijms25010049. – EDN RPOFMC.
3. Simultaneous assessment of NAD(P)H and flavins with multispectral fluorescence lifetime imaging microscopy at a single excitation wavelength of 750 nm / B. Yakimov, A. Komarova, E. Nikonova [et al.] // Journal of Biomedical Optics. – 2024. – Vol. 29, No. 10. – DOI 10.1117/1.jbo.29.10.106501. – EDN GFYICY.
4. Effects of FOLFOX Chemotherapy on Tumor Oxygenation and Perfused Vasculature: An In Vivo Study by Optical Techniques / I. Druzhkova, K. Bylinskaya, A. Plekhanov [et al.] // Journal of Biophotonics. – 2024. – DOI 10.1002/jbio.202400339. – EDN KGBCDF.
5. Метаболическая гетерогенность опухолей / М. В. Ширманова, С. Д. Синюшкина, А. Д. Комарова // Молекулярная биология. – 2023. – Т. 57, № 6. – С. 1130-1149. – DOI 10.31857/S0026898423060186. – EDN QIJYQ.
6. Macroscopic temporally and spectrally resolved fluorescence imaging enhanced by laser-wavelength multiplexing / V. I. Shcheslavskiy, D. V. Yuzhakova, D. A. Sachkova [et al.] // Optics Letters. – 2023. – Vol. 48, No. 20. – P. 5309. – DOI 10.1364/ol.501923. – EDN

EBHAMP.

7. Correlation of Plasma Membrane Microviscosity and Cell Stiffness Revealed via Fluorescence-Lifetime Imaging and Atomic Force Microscopy / Yu. M. Efremov, L. Shimolina, A. Gulin [et al.] // Cells. – 2023. – Vol. 12, No. 21. – P. 2583. – DOI 10.3390/cells12212583. – EDN EGIQIN.
8. Biocompatible Phosphorescent O₂ Sensors Based on Ir(III) Complexes for In Vivo Hypoxia Imaging / M. Samandarsangari, D. O. Kozina, V. V. Sokolov [et al.] // Biosensors. – 2023. – Vol. 13, No. 7. – P. 680. – DOI 10.3390/bios13070680. – EDN NMEFQX.
9. Label-free sensing of cells with fluorescence lifetime imaging: The quest for metabolic heterogeneity / E. A. Shirshin, A. V. Gayer, E. E. Nikonova [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2022. – Vol. 119, No. 9. – P. e2118241119. – DOI 10.1073/pnas.2118241119. – EDN DPJSCE.
10. Fluorescence lifetime-based pH mapping of tumors in vivo using genetically encoded sensor SypHerRed / L. Shimolina, E. Zagaynova, I. Druzhkova [et al.] // Biophysical Journal. – 2022. – DOI 10.1016/j.bpj.2022.02.036. – EDN WIMHKI.
11. Combined Fluorescence and Optoacoustic Imaging for Monitoring Treatments against CT26 Tumors with Photoactivatable Liposomes / I. Turchin, M. Kirillin, A. Orlova [et al.] // Cancers. – 2022. – Vol. 14, No. 1. – DOI 10.3390/cancers14010197. – EDN NICNRT.
12. FUCCI-Red: a single-color cell cycle indicator for fluorescence lifetime imaging / M. V. Shirmanova, A. I. Gavrina, A. V. Polozova [et al.] // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2021. – Vol. 78, No. 7. – P. 3467-3476. – DOI 10.1007/s00018-020-03712-7. – EDN AZQXGB.
13. Biocompatible ir(III) complexes as oxygen sensors for phosphorescence lifetime imaging / I. S. Kritchenkov, A. I. Solomatina, D. O. Kozina [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26, No. 10. – DOI 10.3390/molecules26102898. – EDN KPMMLC.
14. Red light-emitting water-soluble luminescent iridium- containing polynorbornenes: Synthesis, characterization and oxygen sensing properties in biological tissues in vivo / L. N. Bochkarev, Y. P. Parshina, Y. V. Gracheva [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26, No. 21. – DOI 10.3390/molecules26216349. – EDN KWXVGX.
15. Simultaneous Probing of Metabolism and Oxygenation of Tumors In Vivo Using FLIM of NAD(P)H and PLIM of a New Polymeric Ir(III) Oxygen Sensor / Parshina YP, Komarova AD, Bochkarev LN, [et al.] // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23 No. 18. – P. 10263. doi: 10.3390/ijms231810263. – EDN QHLCOK.
16. Insight into redox regulation of apoptosis in cancer cells with multiparametric live-cell microscopy / Shirmanova, M.V., Gavrina, A.I., Kovaleva, T.F. [et al.] // Sci Rep . – 2022– Vol. 12, No. 4476. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08509-1>. – EDN WRZYJF.

Официальный оппонент

Ширманова Марина Вадимовна

8.10.2025

Подпись Ширмановой М.В. заверяю:
Ученый секретарь университета,
кандидат биологических наук, доцент

Сорокина Ю.А.