

## **ОТЗЫВ**

### **официального оппонента**

на диссертационную работу Альзеибак Разан «Механизмы гибели опухолевых клеток при действии фотосенсибилизаторов разной природы на примере фотосенса и фотодитазина», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 — «биофизика» (биологические науки)

### **Актуальность избранной темы**

Диссертационная работа Разан Альзеибак посвящена исследованию механизмов, вовлеченных в развитие ответа клетки на действие соединений, обладающих фотодинамической активностью. В работе исследуется связь между физико-химическими свойствами фотосенсибилизатора и путями индуцируемой им клеточной гибели. Тематика работы обладает несомненной актуальностью, определяемой интенсивным развитием новых подходов и инструментария фотодинамической терапии для лечения широкого спектра злокачественных новообразований и неонкологических заболеваний. Клеточный ответ на действие фотосенсибилизаторов представляет собой комплекс реакций на уровне различных регуляторных систем, включающих образование и утилизацию активных форм кислорода и продуктов окисления биомолекул, модуляцию активности факторов, регулирующих клеточную гибель, индукцию или репрессию транскрипционных факторов и изменение экспрессии генов. Вследствие сложности клеточного ответа на действие фотосенсибилизаторов, полной картины закономерностей развития фотодинамического действия до настоящего времени не существует, что подчеркивает ценность исследовательской работы в соответствующей области. Практическая значимость представленного исследования также не вызывает сомнений и связана с необходимостью теоретических и экспериментальных обоснований развития персонифицированных подходов к фотодинамической

терапии, основанных на специфике ответа на терапию опухолевых клеток с разными генетическими особенностями.

### **Краткая характеристика основного содержания диссертации**

Диссертационное исследование Разан Альзеибак построено по традиционной схеме. Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы (глава 1), материалов и методов (глава 2), результатов и их обсуждения (глава 3), заключения, выводов и списка цитированной литературы (215 источников). Иллюстративный материал включает 28 рисунков и 3 таблицы.

Во вводной части автором обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и задачи, обоснована научная новизна и научно-практическая значимость результатов, приведены сведения по апробации работы и публикациям.

Обзор литературы включает три раздела. Рассмотрены механизмы фотохимических реакций при фотодинамическом воздействии и запускаемые цепные свободно-радикальные процессы; приведена краткая характеристика классов соединений, используемых в настоящее время в качестве фотосенсибилизаторов. Большое внимание уделено мишеням фотодинамического воздействия на клетку и роли отдельных клеточных органелл в реализации конечного эффекта. Заключительная часть обзора описывает актуальные представления о молекулярных механизмах реализации различных видов клеточной смерти. Приведен перечень экспериментальных работ, в которых была показана возможность индукции принципиально разных видов регулируемой клеточной смерти при фотодинамическом воздействии. Наиболее подробно описаны типы клеточной гибели, исследованные автором в экспериментальной части диссертационного исследования, а именно апоптоз, некроптоз и ферроптоз. В целом, обзор сделан по большому количеству современных научных источников, дает хорошее представление об изучаемой проблеме и подтверждает актуальность и обоснованность сформулированной цели исследования.

В главе «Материалы и методы» приведены все необходимые сведения об использованных объектах, дизайне экспериментов, методических подходах и особенности их реализации. Использованные диссертантом методы свидетельствуют о хорошем владении биофизическим инструментарием. Стоит отметить широкое применение методов, основанных на флуоресцентном анализе, позволяющих не только количественно измерить исследуемый параметр, но и проанализировать ответ индивидуальных клеток путем их визуализации. Автор использовал современные методы спектрометрии, флуоресцентной конфокальной микроскопии и проточной цитометрии, в том числе с использованием флуоресцентных зондов и генетически трансформированных клеток, а также применял ингибиторный анализ и метод иммуноблотинга. Использованные методы и подходы, а также проведенная статистическая обработка результатов адекватны поставленным задачам.

В главе «Результаты и их обсуждение» подробно изложены полученные автором результаты и проведен их анализ. Для исследования диссертантом были выбраны два соединения с принципиально различающимися физико-химическими свойствами, что обусловлено поставленной целью. На культурах опухолевых клеток разного происхождения показано, что выбранные соединения действительно отличаются по своей внутриклеточной локализации, что позволило в дальнейшем сравнить ответ клеток на первичное повреждение разных мишеней. Диссертантом установлены значения IC50 для исследуемых соединений как в темновом режиме, так и при фотовозбуждении, определены режимы воздействия, приводящие к идентичным ответам с точки зрения жизнеспособности культуры клеток. Ключевая часть работы описывает результаты исследования типа клеточной гибели при воздействии исследуемых фотосенсибилизаторов. Диссертантом показано, что локализованный преимущественно в лизосомах фотосенсибилизатора Фотосенс индуцирует гибель клеток с характерными признаками апоптоза и ферроптоза: экстернализация фосфатидилсерина, активация каспазы 3, высокий уровень

перекисного окисления липидов и защитное действие ингибиторов данных видов смерти. Фотодитазин, локализующийся в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, приводит к активации клеточной гибели с характерными признаками апоптоза и некроптоза, в том числе включающие фосфорилирование ключевого белка некроптоза MLKL, а также подавление клеточного ответа на Фотодитазин при использовании соответствующих ингибиторов клеточной гибели.

Анализ результатов с привлечением литературных источников позволил автору построить обобщающую схему, приведенную в заключении, демонстрирующую связь между физико-химическими свойствами, внутриклеточной локализацией фотосенсибилизатора и типом индуцируемой им клеточной гибели.

Выводы работы обоснованы, корректно отражают полученные автором данные и полностью соответствуют поставленным цели и задачам работы.

### **Степень обоснованности положений и выводов, сформулированных в диссертации**

Научные положения и выводы сформулированы в диссертации на основе применения научно-обоснованных теорий, систематизированных опубликованных научных данных и непротиворечивых результатов собственных исследований, проведенных автором диссертации. Исследования были проведены с использованием современного исследовательского оборудования на адекватно выбранных экспериментальных моделях, методические подходы соответствуют поставленным задачам. Наблюдаемые закономерности подтверждены комплексом исследований на разных экспериментальных объектах. В основу выводов положены статистически достоверные данные. Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения.

## **Новизна научных положений и выводов**

Полученные диссертантом результаты являются новыми и научно значимыми как с точки зрения углубления имеющихся фундаментальных представлений о механизмах ответа клеток на действие фотодинамических агентов, так и с точки зрения их применения для развития персонафицированных подходов к фотодинамической терапии и рационального дизайна фотосенсибилизаторов с заданными свойствами. Все результаты получены лично автором либо с его непосредственным участием. Основные положения диссертационной работы представлены в 12 публикациях, 6 из них опубликованы в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

## **Замечания и вопросы по тексту диссертационной работы**

В тексте отсутствуют некоторые подтверждающие ссылки на источники. Так, на стр. 7 указан прогноз МАИР, на стр. 37 дается описание микро-аутофагии, однако соответствующих ссылок не приведено.

Во введении следовало бы более детально обосновать задачу 2 (определение цитотоксичности клинически применяемых фотосенсибилизаторов), поскольку ФС, применяемые в клинике, вероятно, хорошо изучены.

На стр. 21 упоминается механизм интернализации ФС путем облегченного транспорта с помощью липидов и белков сыворотки. Если речь идет об облегченной диффузии, то она осуществляется с помощью специализированных белков-переносчиков. По-видимому, речь в тексте диссертации идет о механизме транспорта, не связанного с работой переносчиков, и желательно было бы дать некоторую расшифровку этого термина.

В тексте отмечено незначительное количество опечаток и стилистических неточностей, например, на стр. 23 («специфические сигнальных», «генерировать ... образование»), стр. 28 («ФДТ способно»), стр. 33 («ингибировать регулируемой формы»), стр. 33-34 («наблюдается взаимодействие ... и каталитическая

активность»), стр. 38 («несколько белков генов»), стр. 44 («генетически-кодируемый» следует писать отдельно), стр. 52 («каспазой [абзац] 3»), стр. 53 («в течение 1 час», «Затем чего»), стр. 58 («Локализация исследуемых фотосенсибилизаторов была исследована»), стр. 73 («Тогда как»), стр. 82 («фотодинамического действие»), стр. 85 («показывающих, возможность»).

В тексте диссертации часто опускаются необходимые сокращения единиц измерения, такие как «ч» для обозначения часов и «мин» для обозначения минут. Вместо термина «клеточная смерть» желательнее было бы использовать «клеточная гибель».

В разделе «Материалы и методы» на стр. 44 приведены используемые для работы линии клеток, однако не дано обоснование применения для работы выбранных линий клеток.

На стр. 48 указана длина волны для определения оптической плотности растворов МТТ-формаза, однако опущена информация о референсной длине волны для оценки неспецифической сорбции растворов.

На стр. 54 в описании метода опущен этап осветления лизатов центрифугированием, который является важным для удаления нерастворимого материала.

Раздел «Результаты и их обсуждение» начинается с исследования фотофизических свойств двух известных фотосенсибилизаторов. Необходимость подобного исследования известных молекул выглядит недостаточно обоснованной, тем более, что результаты данного исследования не нашли отражения в выводах.

При исследовании цитотоксических свойств ФС в качестве контроля применялась обработка клеток фотосенсибилизатором в присутствии и в отсутствие облучения, однако отсутствует контроль влияния на клетки облучения в отсутствие ФС.

На рис. 12, 13, 15, 16, 23 и 24 желательно было бы указать, какой именно параметр оценивается в каждом ряду или столбце, отсутствие информации о наблюдаемом параметре несколько затрудняет восприятие этих рисунков.

При обсуждении влияния на жизнеспособность клеток фотосенсибилизаторов в присутствии ингибиторов разных путей клеточной гибели часто используется определение «существенно», хотя более уместно было бы употребление «статистически достоверно», поскольку многие ингибиторы клеточной гибели подавляли эффект ФС на 15-20%, что вряд ли можно определить как существенное влияние.

В тексте диссертации даются отсылки к результатам, описанным в предыдущих главах, однако не дается ссылок на соответствующие рисунки, что затрудняет восприятие материала.

Все указанные замечания не уменьшают научную значимость проведенного исследования, не снижают степени обоснованности выводов и не снижают общей высокой оценки качества выполненной работы.

### **Заключение**

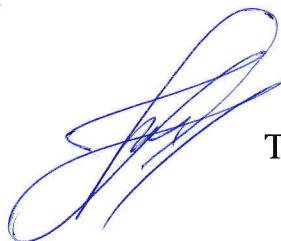
Диссертационная работа Альзейбак Разан является законченной научно-квалификационной работой. Тематика исследования актуальна, а само исследования выполнено на современном экспериментальном уровне. Основные научные результаты обладают несомненной научной новизной и достоверностью; выводы и сформулированные научные положения обоснованы. Работа имеет как научную, так и в перспективе практическую значимость.

Основные полученные результаты в должной мере отражены в публикациях в рецензируемых изданиях. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Диссертационная работа Р. Альзейбак соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства

Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Заведующий отделом кинетики  
химических и биологических  
процессов  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Институт проблем химической  
физики Российской академии  
наук,  
кандидат биологических наук



Терентьев Алексей Алексеевич

«10» июня 2021 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химической физики Российской академии наук

Адрес: 142432, Московская обл., г. Черноголовка, пр-т академика Семёнова, д.1

Телефон: +7 (903) 727-79-38

E-mail: alexei@icp.ac.ru

Подпись Терентьева А.А. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУН ИПХФ РАН, д.х.н.



Б.Л. Психа