

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.2.340.06,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
АВТОНОМНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
НИЖЕГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. Н.И. ЛОБАЧЕВСКОГО» МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 08.07.2021 г. № 4

О присуждении Альзеибак Разан, гражданке Сирии, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Механизмы гибели опухолевых клеток при действии фотосенсибилизаторов разной природы на примере фотосенса и фотодитазина» по специальности **03.01.02 – биофизика** принята к защите 22.04.2021 г., протокол № 2, диссертационным советом 24.2.340.06, созданным на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, приказ Минобрнауки РФ от 14 октября 2016 года № 1256/нк).

Соискатель, Альзеибак Разан, 1986 года рождения. В 2016 г. Альзеибак Разан окончила магистратуру федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» по направлению подготовки «06.04.01 – Биология». В период с 2016 по 2020 г. обучалась в аспирантуре при кафедре биофизики Института биологии и

биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского и успешно освоила образовательную программу. Диплом об окончании аспирантуры № 105204 0038497, регистрационный номер 18/37-110 выдан 08 октября 2020 г. ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Справка об обучении и сдаче кандидатских экзаменов от 05 апреля 2021 г., регистрационный номер 024/21 выдана ННГУ им. Н.И. Лобачевского. В период подготовки диссертации Альзеибак Разан обучалась в аспирантуре при кафедре биофизики Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского.

Диссертация прошла апробацию на кафедре биофизики Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Научный руководитель – кандидат биологических наук, Балалаева Ирина Владимировна, доцент по специальности 03.01.02 – биофизика, доцент кафедры биофизики Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского.

Официальные оппоненты:

Горин Дмитрий Александрович – доктор химических наук, профессор по специальности 03.01.02 – биофизика, профессор центра фотоники и квантовых материалов Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий» (г. Москва);

Тереньтьев Алексей Алексеевич – кандидат биологических наук, заведующий отделом кинетики химических и биологических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт проблем химической физики» Российской академии наук (г. Черноголовка);

дали положительные отзывы на диссертацию.

В положительном отзыве официального оппонента д.х.н. Горина Дмитрия Александровича отмечено, что диссертационная работа Альзеибак Р. «Механизмы гибели опухолевых клеток при действии

фотосенсибилизаторов разной природы на примере фотосенса и фотодитазина» является законченной научно-квалификационной работой, лежит в области исследования механизмов биологического действия агентов для ФДТ опухолей. Основная задача работы заключается в установлении типа клеточной смерти при действии различных фотосенсибилизаторов и выявлении роли фактора локализации красителя в клетке. Проведенное исследование актуально, обладает высокой научной ценностью и практической значимостью, существенно дополняет фундаментальные представления о молекулярно-клеточных механизмах ответа на фотодинамическое воздействие. Практическая значимость работы обусловлена возможностью использовать полученные данные при разработке новых фотосенсибилизаторов.

Замечания и вопросы по тексту диссертационной работы:

1. Стр. 47. В работе описаны два режима облучения: при длине волны 615-635 нм в дозе 20 Дж/см² с плотностью мощности 20 мВт/см² в течение 16 мин 40 секунд, и при длине волны 655-675 нм в дозе 20 Дж/см² с плотностью мощности 32 мВт/см² в течение 10 мин 25 секунд. Выбор длин волн определяется максимумом поглощения фотодинамических красителей. Почему авторы использовали разное время облучения?
2. Стр. 84. Согласно рис. 28, оба сенсбилизатора вызывают по два механизма клеточной гибели, которые авторы объясняют отличием распределения накопления фотодинамического красителя в клетке. Интересно было бы узнать мнение автора работы о перспективах сочетанной терапии, т.е. при использовании двух препаратов. Может ли это вызвать синергический эффект, и если да, то почему?
3. Чем был обусловлен выбор клеточных линий, на которых проводились эксперименты, и как соотносятся результаты полученных на этих клеточных линиях с данными других авторов?

4. В работе часто используется термин «углеводородный хвост», что является в некотором смысле научным сленгом, и более корректно использовать термин – углеводородный радикал.

Несмотря на высказанные замечания, диссертационная работа Альзеибак Р. «Механизмы гибели опухолевых клеток при действии фотосенсибилизаторов разной природы на примере фотосенса и фотодитазина», несомненно, является научным исследованием, выполненным на высоком научном уровне, и соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 4 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.

В положительном отзыве официального оппонента к.б.н. Терентьева Алексея Алексеевича отмечено, что диссертация Альзеибак Р. «Механизмы гибели опухолевых клеток при действии фотосенсибилизаторов разной природы на примере фотосенса и фотодитазина» является законченной научно-квалификационной работой. Тематика исследования актуальна, а само исследование 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.

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 раздельно), 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» желательно 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.

Диссертационная работа Альзеибак Р. «Механизмы гибели опухолевых клеток при действии фотосенсибилизаторов разной природы на примере

фотосенса и фотодитазина» соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 4 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.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва), в своем положительном отзыве, подписанном **Негребецким Вадимом Витальевичем**, д.х.н., проф. РАН, лауреатом государственной премии РФ, руководителем центра GLP исследований, заведующим отделом медицинской химии и токсикологии, заведующим кафедрой химии лечебного факультета, и утвержденным **Ребриковым Денисом Владимировичем**, д.б.н., проф. РАН, проректором по научной работе, указала, что диссертационная работа Альзеибак Р. «Механизмы гибели опухолевых клеток при действии фотосенсибилизаторов разной природы на примере фотосенса и фотодитазина» является законченной научно-квалификационной работой. Диссертационная работа Альзеибак Р. посвящена изучению механизмов гибели опухолевых клеток при действии ФС разной природы, а ее результаты имеют фундаментальное и практическое значение. Важным результатом с точки зрения фундаментальной науки представляется расширение представлений о механизмах ответа клеток на фотодинамическое воздействие и факторах, определяющих судьбу клетки. Последний аспект имеет в перспективе и прикладное значение, поскольку полученные знания могут быть применены при разработке новых фотосенсибилизаторов, а также схем и режимов терапии онкологических заболеваний. Диссертантом впервые продемонстрирована возможность индукции смешанного типа клеточной смерти, демонстрирующего черты

апоптоза и ферроптоза, при фотодинамическом воздействии с гидрофильным ФС. В случае амфифильного мембранотропного ФС показано сочетание черт некроптоза и апоптоза. По своей актуальности, объему проведенных исследований и значимости полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 — «биофизика».

Принципиальных замечаний к рецензируемой диссертационной работе нет. Однако, следует отметить следующее:

1. Научно-популярная, в ряде случаев, терминология. В частности, термин «рак» лучше заменить там, где это возможно, на «онкология» или «онкологические заболевания».

2. На стр. 4 автореферата упоминается «схема, объясняющая взаимосвязь между фотохимическими свойствами ФС и потенциальными видами индуцируемой ими клеточной смерти». На наш взгляд использование словосочетания «объясняющая взаимосвязь» чрезмерно прямолинейно. Полученные диссертантом данные, безусловно, позволяют сделать на данном этапе лишь, хоть и вполне обоснованное, но пока только предположение. Это открывает новую область для дальнейших работ по систематизации и обобщению полученных результатов. Отметим также, что сама схема (рис. 17), безусловно – красивая, но очень плохо читаема.

3. Представляется необходимым на стр. 5 автореферата конкретизировать круг ВУЗов, которые могли бы использовать полученные данные в учебном процессе. К их числу можно смело отнести РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

4. Имеются незначительные опечатки, повторы, жаргонизмы (сжимание, ошаривание и др.), например, «...в присутствии в среде йодида пропидиума...» (стр. 7), неудачные, на наш взгляд, словосочетания,

например, «...слабая полоса Q-полоса поглощения на длине волны...» (стр. 8). Сокращения лучше приводить в одном стиле, в данном случае DMSO вместо ДМСО (стр. 14). Не понятно, с какой целью авторы дают расшифровку общепринятых сокращений, в частности – FRET (на стр. 16).

5. Подписи к некоторым рисункам, в частности, Рис. 2 (стр. 9), представляются малоинформативными, было бы целесообразно указать также марку прибора, на котором проводилось исследование, а также условия регистрации спектров.

6. При обсуждении результатов инкубации клеток с ФС в темноте (стр. 10 автореферата), авторы отмечают «негативное действие соединений только при ...», при этом не приводят критерии такого «негативного действия».

7. На стр. 11 рассматриваются морфологические особенности фотосенсибилизированных клеток и скорость пермеабилзации клеточной мембраны. Упоминается о серии экспериментов по мониторингу пермеабилзации мембраны после краткосрочного воздействия. Здесь представляется целесообразным указать параметры такого воздействия.

8. На стр. 14 отмечается «... отсутствие защитного эффекта ловушки липидных радикалов Ferr-1 или хелаторов железа ...» в случае фотодитазина и, на стр. 19, «... ловушка липидных радикалов ферростатин-1 защищал клетки от фотодинамического действия фотосенса...». В этой связи интересно мнение авторов о связи свободнорадикального механизма клеточной смерти от природы используемого ФС.

Соискатель имеет 12 опубликованных научных работ по теме диссертации, из них 6 публикаций в рецензируемых научных изданиях, включённых в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 6 тезисов в материалах конференций. Опубликованные работы посвящены механизмам поступления фотосенсибилизаторов в клетки и их фотобиологического

действия. Опубликованные работы в полной мере отражают результаты диссертационного исследования.

Авторский вклад соискателя составляет около 80%. Недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, в диссертации Альзейбак Р. отсутствуют.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Kutova O.M., Guryev E.L., Sokolova E.A., **Alzeibak R.**, Balalaeva I.V. Targeted delivery to tumors: multidirectional strategies to improve treatment efficiency // *Cancers (Basel)*. 2019. V. 11 (1). P. 68 (1-33).
2. Turubanova V.D., Balalaeva I.V., Mishchenko T.A., Catanzaro E., **Alzeibak R.**, Peskova N.N., Efimova I., Bachert C., Mitroshina E.V., Krysko O., Vedunova M.V., Krysko D.V. Immunogenic cell death induced by a new photodynamic therapy based on photosens and photodithazine // *Journal for immunotherapy of cancer*. 2019. V. 7 (1). P. 350 (1-13).
3. Mishchenko T.A., Turubanova V.D., Mitroshina E.V., **Alzeibak R.**, Peskova N.N., Lermontova S.A., Klapshina L.G., Balalaeva I.V., Vedunova M.V., Krysko D.V. Effect of novel porphyrazine photosensitizers on normal and tumor brain cells // *Journal of biophotonics*. 2019. V. 13 (1). P. e201960077 (1-9).
4. Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Турубанова В.Д., **Альзейбак Р.**, Балалаева И.В., Ведунова М.В., Krysko D.V. Сравнительный анализ действия фотосенсибилизаторов фотосенс, фотодитазин и гиперацин на клетки глиомы и первичные нейрональные культуры in vitro // *Современные технологии в медицине*. 2019. Т. 11. № 4. С. 52-63.
5. **Alzeibak R.**, Mishchenko T.A., Shilyagina N.Y., Balalaeva I.V., Vedunova M.V., Krysko D.V. Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future // *Journal for immunotherapy of cancer*. 2021. V. 9 (1). P. e001926 (1-22).

6. **Alzeibak R.**, Peskova N.N., Kutova O.M., Shanwar S., Balalaeva I.V. Mechanisms of photodynamic killing of cancer cells by photodithazine. Opera medica et physiologica. 2021. V. 8(1). P. 51-61.

Указанные публикации входят в перечень ВАК и международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus.

На диссертацию и автореферат поступило 4 отзывов, все положительные. В отзывах указывается, что представляемая работа характеризуется высоким теоретическим и экспериментальным уровнем, по своей новизне и актуальности имеет большое научное и практическое значение, соответствует требованиям Высшей аттестационной комиссии.

Отзывы получены из:

1. ИПФ РАН за подписью кандидата физико-математических наук, зав. отделом радиофизических методов в медицине **Турчина Ильи Викторовича**, без замечаний;
2. Института биофизики клетки РАН за подписью, к.б.н., с.н.с. лаборатории геномного редактирования и трансгенеза **Вороновой Евгении Александровны**, в котором в качестве замечаний, не снижающих общую высокую оценку данной работы, отмечено, что при описании флуоресцентного зонда Bodipy 581/591 C11 стоило конкретизировать, каким именно образом изменяется соотношение интенсивностей его флуоресценции в зеленой и красной областях спектра при окислении. Также не вполне удачным является использование термина «краситель» как синонима фотосенсибилизатора, поскольку в экспериментах автор использует разнообразие красителей, что приводит к путанице;
3. Института белка РАН за подписью, д.ф.-м.н., руководителя группы спектроскопии белка, главн. научн. сотрудника **Мельника Богдана Степановича**, без замечаний;
4. ФГБОУ ВО "ПИМУ" Минздрава России за подписью, к.б.н., директор НИИ Экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий **Сироткиной Марины Александровны**, где в качестве замечаний

отмечается мелкий шрифт на рисунках, особенно на рисунке 3 и неудачно выбранный фиолетовый цвет в схеме на рисунке 17, на нем плохо видна надпись.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их соответствием критериям требований, изложенных в пп. 22 и 24 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842: являются компетентными по заявленной в диссертации специальности, имеют профильные публикации по проблеме диссертационного исследования и способны объективно оценивать актуальность темы диссертации, а также достоверность, теоретическую значимость и научно-практическую ценность полученных в работе результатов (сведения о них размещены на официальном сайте ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»: <https://diss.unn.ru/1121>).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- доказана возможность индукции клеточной гибели смешанного типа, сочетающей черты апоптоза и ферроптоза, при фотодинамическом воздействии с гидрофильным фотосенсибилизатором;
- доказана возможность индукции клеточной гибели смешанного типа, сочетающей черты некроптоза и апоптоза при действии мембранотропного фотосенсибилизатора;
- предложена схема, объясняющая взаимосвязь между фотохимическими свойствами фотосенсибилизаторов и потенциальными видами индуцируемой ими клеточной смерти.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- установлена относительная фотодинамическая активность соединений фталоцианинового и хлоринового ряда в отношении ряда опухолевых клеток разного происхождения;

- изучены механизмы клеточной смерти, запускаемые при действии фотосенсибилизаторов с разными физико-химическими свойствами, и получены новые данные, расширяющие и дополняющие теоретические представления в соответствующей области;
- получены экспериментальные подтверждения гипотезы, что внутриклеточная локализация фотосенсибилизатора является ключевым фактором, от которого зависит индукция конкретных молекулярных механизмов, реализующих гибель клетки.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

- определены возможности целенаправленной индукции того или иного вида гибели опухолевых клеток при проведении фотодинамической терапии, что позволяет повысить эффективность лечения;
- сформулированы предпосылки для рационального дизайна фотосенсибилизаторов с заданными фотобиологическими свойствами
- получены знания, которые будут использованы в учебном процессе в рамках курсов для студентов, обучающихся по биологическим и медицинским специальностям.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- результаты получены на современном высокотехнологичном оборудовании, с использованием надежных апробированных экспериментальных методов;
- показана воспроизводимость экспериментальных данных;
- установлено качественное и количественное согласие с теоретическими выводами и обоснованиями, а также с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике.

Личный вклад соискателя состоит в участии в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая выбор объектов исследования, подбор перечня анализируемых показателей, сбор и обработку полученных

результатов, их анализ и обсуждение, а также подготовку научных статей и представление результатов на конференциях.

Диссертация является целостным, законченным научным исследованием, охватывает основные вопросы поставленной научной проблемы и соответствует критериям внутреннего единства, что подтверждается четкой логикой и соответствующей содержанию работы структурой исследования, формулировками цели работы и выводов на основании полученных результатов. Диссертация соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842.

На заседании 8 июля 2021 года диссертационный совет принял решение присудить Альзеибак Разан ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

При проведении открытого голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 9 докторов наук по специальности 03.01.02 – биофизика, участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, 9 человек участвовали дистанционно, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали:

за 19, против 0, не участвовало в голосовании 0.

Председатель
диссертационного совета



Воденеев Владимир Анатольевич

Ученый секретарь
диссертационного совета

Акинчиц Елена Константиновна

8 июля 2021 года