

Минздрав России

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)

Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634050

Телефон (3822) 53 04 23;

Факс (3822) 53 33 09

e-mail: office@ssmu.ru

http://www.ssmu.ru

ОКПО 01963539 ОГРН 1027000885251

ИНН 7018013613 КПП 701701001

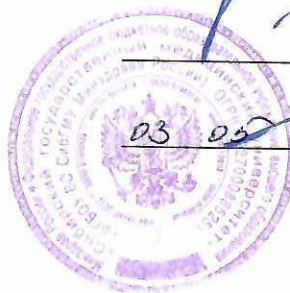
УТВЕРЖДАЮ

Ректор

Д-р мед наук, доцент

Е.С. Куликов

2023



№ 6/11
На № _____ от _____

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация «Редокс-зависимые механизмы нарушения регуляции апоптоза клеток линии Р19 при гипоксии» выполнена на кафедре патофизиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России).

В период подготовки диссертации соискатель Орлов Дмитрий Сергеевич обучался в очной аспирантуре на кафедре патофизиологии с 01.09.2012 по 31.08.2015. С 01.12.2018 по настоящее время соискатель кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. Работает в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации ассистентом кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики с 01.09.2016 по настоящее время.

В 2012 г. окончил Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации по специальности медицинская биохимия.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2023 г. федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель – Носарева Ольга Леонидовна, доктор медицинских наук, работает в должности профессора кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации

Соискатель принимал участие в разработке дизайна исследования, организации и проведении экспериментальных работ, выполнении практической части исследования. Соискателем самостоятельно получены результаты, проведена их статистическая обработка и интерпретация. Принимал непосредственное участие в подготовке публикаций материалов по теме диссертации (тезисы, статьи). Оформление автореферата и диссертации выполнены лично соискателем.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Высокая степень достоверности полученных результатов обоснована достаточным количеством экспериментального материала, использованием современных высокотехнологичных молекулярно-биологических, биохимических методов исследования (ингибиторный анализ, моделирование гипоксии, культуральный метод, проточная цитометрия, спектрофотометрия, спектрофлуориметрия) и оборудования, адекватных целям и задачам. Полученные результаты статистически обработаны с помощью современных методов доказательной медицины. Основные положения, выносимые на защиту, выводы научно обоснованы и логично вытекают из результатов диссертационного исследования.

Материалом для исследования служили опухолевые клетки линии P19 (тератокарцинома мыши СЗН/Не), полученные из Российской коллекции клеточных культур ФГБУН Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия). Опухолевые клетки линии P19 культивировали при нормоксии и гипоксии в условиях модуляции редокс-статуса с помощью либо блокатора SH-групп пептидов и белков N-этилмалеимида, либо протектора тиоловых групп пептидов и белков 1,4-дитиоэритритола, либо предшественника синтеза глутатиона N-ацетилцистеина в конечной концентрации 5 мМ. Количественную оценку аннексин-, Fas- и TNF RI-положительных клеток и клеток со сниженным митохондриальным потенциалом; внутриклеточного

содержания АФК, ионов Ca^{2+} в цитоплазме проводили методом проточной цитометрии. Спектрофотометрическим методом оценивали внутриклеточную продукцию гидроксильного радикала, содержание SH-групп белков, белково-связанного глутатиона, карбонильных производных белков, общего, восстановленного и окисленного глутатиона, дополнительно рассчитывая величину соотношения восстановленного глутатиона к окисленному как показатель редокс-статуса клетки; активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы; концентрацию общего белка. Исследование выполнено на базе кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий кафедрой – д-р мед. наук, доцент Спирина Л.В.), научно-образовательного центра молекулярной медицины ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (руководитель – канд. мед. наук, доцент Шахристова Е.В.) и лаборатории биологических моделей ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (руководитель – канд. биол. наук, доцент Иванов В.В.).

Научная новизна результатов исследования

Впервые получены новые знания фундаментального характера, отражающие состояние системы глутатиона и ее участие в молекулярных механизмах окислительной модификации белков опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии. Новыми являются данные, отражающие роль глутатионилирования и карбонилирования протеинов в редокс-зависимой реализации и регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19, культивированных в условиях нормоксии и гипоксии.

Показано, что в условиях гипоксии в опухолевых клетках линии P19 происходила активация апоптоза преимущественно по митохондриальному пути, сопряженная с изменением редокс-статуса системы глутатиона, усилением наработки активных форм кислорода и накоплением окислительно-модифицированных протеинов. В условиях внутриклеточного редокс-модулирования при нормоксии в опухолевых клетках линии P19 проапоптотический эффект при блокировании SH-групп пептидов и белков опосредован как обратимой, так и необратимой окислительной модификацией протеинов, при восстановлении SH-групп пептидов и белков и действии предшественника синтеза глутатиона – только свободными SH-группами протеинов. При гипоксии действие N-этилмалеимида (блокатора SH-групп) в изучаемых клетках вызывало активацию апоптоза на фоне активации карбонилирования белков, а эффект N-ацетилцистеина (предшественника синтеза глутатиона) сопровождался снижением содержания белково-связанного глутатиона и карбонильных производных белков, 1,4-дитиозэритритола (протектора SH-групп) – только снижением глутатионилирования на фоне антиапоптотического эффекта.

В ходе проведенного исследования доказано, что глутатионилирование и карбонилирование белков представляют собой редокс-зависимые

молекулярные механизмы, а компоненты системы глутатиона – молекулярные мишени управления апоптотической гибелью опухолевых клеток линии Р19 при нормоксии и гипоксии.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Проведенное исследование расширяет представления о патогенезе опухолевого роста в условиях гипоксии. Установлена роль системы глутатиона и окислительной модификации белков в нарушении редокс-зависимой регуляции и реализации апоптоза опухолевых клеток линии Р19 при нормальном напряжении кислорода и гипоксии. Новые знания о механизмах редокс-регуляции клеточной гибели в условиях окислительного стресса, индуцированного низким напряжением кислорода в опухолевых клетках линии Р19, могут стать основой для разработки способов регуляции и реализации апоптотической клеточной гибели при формах патологии, сопровождающихся формированием гипоксии. Полученные фундаментальные данные об особенностях участия системы глутатиона в окислительной модификации белков могут быть использованы для разработки новых технологий селективной регуляции и реализации апоптоза опухолевых клеток в условиях гипоксии.

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедр патофизиологии, биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики.

Ценность научных работ соискателя и полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из них 5 статей в научных журналах, включенных ВАК при Минобрнауки России в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 1 статья в журнале, индексируемом РИНЦ, 3 статьи в сборнике научных трудов и 8 публикаций в материалах конференций и конгрессов.

1. Глутатионилирование белков в опухолевых клетках линии Р19 при моделировании гипоксии *in vitro* / Д.С. Орлов, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, О.Л. Носарева, В.В. Иванов, Е.В. Шахристова // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 8, Ч. 1. – С. 130-131.

2. Изменение системы глутатиона в клетках опухолевой линии Р19 при гипоксии / Д.С. Орлов, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, В.В. Иванов // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2015. – Т. 14, № 4. – С. 41-45. **Импакт-фактор РИНЦ 0,461**

3. Активность ферментов антиоксидантной защиты в опухолевых клетках линии Р19 при моделировании гипоксии *in vitro* / Д.С. Орлов, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, В.В. Иванов, Е.В. Шахристова // Материалы VIII Всероссийского с международным участием конгресса

молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2015». – Новосибирск, 5-9 октября 2015 г. – Новосибирск : Новосиб. гос. ун-т, 2015. – С. 48.

4. Роль системы глутатиона в реализации пролиферации и апоптоза опухолевых клеток при гипоксии и модуляции редокс-статуса / Е.В. Шахристова, Д.С. Орлов, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, В.В. Иванов, Н.В. Рязанцева // Сборник трудов IX Международной конференции «Биоантиоксидант». – Москва, 29 сентября – 2 октября 2015 г. – Москва : РУДН, 2015. – С. 233-238.

5. Влияние протектора и блокатора тиоловых групп на регуляцию апоптоза опухолевых клеток при гипоксии / Д.С. Орлов, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, В.В. Иванов // Злокачественные опухоли. – 2016. – № 4, спецвыпуск 1. – С. 327-328.

6. Механизмы дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19 в условиях модуляции редокс-статуса / Д.С. Орлов, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, В.В. Иванов // **Сибирский онкологический журнал**. – 2016. – Т. 15, № 6. – С. 42-47. **Импакт-фактор РИНЦ 0,460**

7. Влияние N-ацетилцистеина на окислительную модификацию белков и реализацию апоптоза опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии. / Д.С. Орлов, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева // – Acta Nature. – Т. 2, спецвыпуск. – 2016. – С. 191.

8. Редокс-зависимые механизмы дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток при гипоксии / Д.С. Орлов, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, В.В. Иванов // **Сибирский научный медицинский журнал**. – 2017. – Т. 37, № 1. – С. 21-26. **Импакт-фактор РИНЦ 0,368**

9. Влияние N-этилмалеимида и 1,4-дитиоэритритола на регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии / Д.С. Орлов, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, М.Ю. Егорова, Д.Ю. Егорова // Сборник материалов XII Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической онкологии» / под ред. Е.Л. Чойнзонова, Э.В. Галажинского, Н.В. Чердынцевой. – Томск, 27-28 апреля 2017 г. – Томск : Изд-во Том. ун-та, 2017. – С 93-94.

10. Роль N-этилмалеимида в управлении апоптозом опухолевых клеток линии P19 / Д.С. Орлов, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, В.В. Иванов // Сборник научных трудов «Генетика человека и патология», посвященной 35-летию Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского НИМЦ / под ред. В.А. Степанова. – Томск, 27-30 ноября 2017 г. – Томск : Литературное бюро, 2017. – Вып. 11. – С. 129-130.

11. Митохондриальный и рецептор-зависимый сигнальные пути активации апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии. / Д.С. Орлов, О.Л. Носарева // Сборник материалов конгресса молодых ученых

«Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» / под ред. Е.Л. Чойнзонова, Э.В. Галажинского, С.В. Попова, Н.А. Бохана, В.А. Степанова, В.В. Жданова. – Томск, 24-25 мая 2018 г. – Томск : Изд-во Том. ун-та, 2018. – С. 290-291.

12. Роль глутатионилирования белков в управлении апоптозом опухолевых клеток линии Р19 при гипоксии. / Д.С. Орлов, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова // Материалы Балтийского симпозиума по иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине с международным участием / под ред. Л.С. Литвиновой, А.Г. Гончарова. – Калининград, 22-23 ноября 2018 г. – Калининград : Изд-во БФУ им. И. Канта, 2018. – С. 56-59.

13. Состояние системы глутатиона в опухолевых клетках линии Р19 при добавлении N-ацетилцистеина в условиях гипоксии. / Д.С. Орлов, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая // Acta Nature. – 2019. – Т. 2, спецвыпуск. – С. 213.

14. Молекулярные механизмы влияния N-этилмалеимида и 1,4-дифенилпиритрилола на регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии Р19 при гипоксии. / О.Л. Носарева, Д.С. Орлов, Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2020. – Т. 19, № 2. – С. 72-77. **Импакт-фактор РИНЦ 0,777**

15. Роль N-ацетилцистеина в регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Р19 при гипоксии. / О.Л. Носарева, Д.С. Орлов, Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, А.А. Садыкова // **Сибирский онкологический журнал**. – 2020. – Т. 19, № 3. – С. 102-108. **Импакт-фактор РИНЦ 0,560**

16. Вовлечение редокс-зависимых механизмов в регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии Р19 при нормоксии и гипоксии / О.Л. Носарева, Д.С. Орлов, Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая // Сборник трудов «Типовые патологические процессы: современные тренды в науке», посвященный 130-летию кафедры патофизиологии Императорского (государственного) Томского университета – Томского медицинского института – Сибирского государственного университета / под ред. член-корреспондента РАН О.И. Уразовой. – Томск, 7-8 сентября 2021 г. – Томск : Изд-во «Печатная мануфактура», 2020. – С. 89-90.

17. Роль редокс-статуса системы глутатиона в реализации апоптотической гибели опухолевых клеток линии Р19 при гипоксии / Д.С. Орлов // Сборник материалов II Дальневосточной конференции молодых ученых «Медицина будущего» – Владивосток, 24-27 апреля 2023 г. – Владивосток : Издательство Дальневосточного федерального университета, 2023. – С. 293-294.

Основные положения и выводы диссертационного исследования опубликованы в полном объеме.

**Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она
рекомендуется к защите**

Диссертационная работа Орлова Дмитрия Сергеевича соответствует паспорту специальности 3.3.3. Патологическая физиология, поскольку целью было установить молекулярные механизмы участия окислительно-модифицированных белков и системы глутатиона в нарушении редокс-регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Р19 при нормоксии и гипоксии *in vitro*. Соискателем показано, что в условиях моделирования гипоксии в опухолевых клетках линии Р19 редокс-зависимая регуляция апоптоза связана с усилением продукции активных форм кислорода, дисбалансом в системе глутатиона, изменением обратимой и необратимой окислительной модификации белков. При этом, как в условиях нормоксии, так при гипоксии, компоненты системы глутатиона выступают в качестве молекулярных мишеней управления апоптотической гибелью опухолевых клеток линии Р19.

Диссертация соответствует следующим пунктам паспорта специальности 3.3.3. Патологическая физиология:

п.2 Изучение механизмов развития заболеваний, типовых патологических процессов и реакций организма на воздействие патогенных факторов, в том числе механизмов формирования патологических систем и нарушений информационного процесса, обуславливающих развитие заболеваний.

п.8 Изучение защитных, компенсаторных и приспособительных реакций организма, развивающихся в ответ на действие повреждающих факторов различной природы и при развитии патологических процессов.

п.10 Анализ взаимоотношений общего и частного, части и целого, единства и борьбы противоположностей в динамике развития патологического процесса или болезни.

Диссертация Орлова Дмитрия Сергеевича на тему «Редокс-зависимые механизмы нарушения регуляции апоптоза клеток линии Р19 при гипоксии» по специальности 3.3.3. Патологическая физиология представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение научной задачи по установлению молекулярных механизмов участия окислительно-модифицированных белков и системы глутатиона в редокс-регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Р19 при нормоксии и в условиях моделирования гипоксии, имеющей значение для развития патологической физиологии и клеточной биологии. Работа полностью соответствует критериям п. 9 Положения «О присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Диссертация «Редокс-зависимые механизмы нарушения регуляции апоптоза клеток линии Р19 при гипоксии» Орлова Дмитрия Сергеевича

Заключение принято на заседании кафедры патофизиологии.
Присутствовали на заседании 17 из 21 чел.
Результаты голосования: «ЗА» – 17 чел., «ПРОТИВ» – 0 чел.,
«ВОЗДЕРЖАЛИСЬ» – 0 чел.; протокол № 7 от 03.05.2023 г.

03.05.2023

Уразова Ольга Ивановна

