

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, доцента, директора Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, профессора кафедры фундаментальной медицины образовательно-научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Литвиновой Ларисы Сергеевны на диссертационную работу Орлова Дмитрия Сергеевича «Редокс-зависимые механизмы нарушения регуляции апоптоза клеток линии P19 при гипоксии», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки)

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Орлова Д.С. посвящена одной из наиболее актуальных в настоящее время проблем современной медико-биологической науки – идентификации молекулярных механизмов редокс-регуляции выживания опухолевых клеток. В связи с высокой частотой возникновения онкологических заболеваний работы, посвященные изучению молекулярных механизмов опухолевого роста, вызывают большой научный интерес. Значительный вклад в реализацию апоптоза вносят митохондрии, выполняющие энергетическую и сигнальную роль. Функционирование этих органелл сопряжено с генерацией активных форм кислорода при изменении напряжения кислорода в клетке. Гипоксия в опухолевых клетках является фактором усиления продукции активных кислородных метаболитов. Опухолевые клетки существуют в уникальных условиях – с одной стороны, в них повышена продукция активных форм кислорода, способствующая инициации опухоли, прогрессии и резистентности к химиотерапии, а с другой, увеличена антиоксидантная и детоксикационная защита от повреждающего эффекта активированных кислородных метаболитов. При этом активные формы кислорода способствуют окислительной модификации белков, в том числе участвующих в апоптозе. Поэтому особого внимания заслуживает изучение триггерных механизмов клеточной гибели опухолевых клеток в условиях гипоксии. В этом случае опухолевая клетка приобретает дополнительные качества, препятствующие реализации апоптотической формы гибели. Данная проблема до сих пор остается насущной.

Актуальным является изучение участия компонентов системы глутатиона в редокс-регуляции внутриклеточного сигналинга и процесса клеточной гибели. Компоненты системы глутатиона являются непосредственными участниками редокс-гомеостаза клетки, а также выступают регуляторами метаболических путей, опосредуя свое действие образованием дисульфидных связей в молекулах белков, которые способствуют изменению их функциональной активности. Наряду с этим в опухолевых клетках при изменении редокс-статуса запускается процесс карбонилирования протеинов. В процесс обратимой и необратимой ковалентной модификации могут быть вовлечены разные внутриклеточные белки, включая факторы транскрипции и ион-транспортирующие системы, способствуя нарушению метаболизма опухолевой клетки. С этой позиции белковые молекулы представляют собой потенциальные молекулярные мишени для селективного управления метаболическими процессами в опухолевых клетках, в том числе клеточной гибелью.

Таким образом, диссертационная работа Орлова Д.С., посвященная определению роли компонентов системы глутатиона и окислительной модификации белков в молекулярном редокс-управлении апоптозом при изменении напряжения кислорода в опухолевых клетках линии P19, является актуальной и научно-практически значимой.

Новизна исследования, полученных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Впервые были получены новые данные фундаментального характера, отражающие состояние системы глутатиона и ее участие в молекулярных механизмах окислительной модификации белковых молекул для редокс-зависимой регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии. Автором диссертации показано, что при моделировании гипоксии в опухолевых клетках линии P19 происходила активация апоптоза преимущественно по митохондриальному пути, сопряженная с накоплением активных форм кислорода, изменением редокс-статуса системы глутатиона и усилением окислительной модификации белковых молекул.

Примененный в работе способ моделирования редокс-состояния опухолевых клеток посредством применения блокатора SH-групп пептидов и протеинов – N-этилмалеимида, предшественника синтеза глутатиона – N-ацетилцистеина и протектора SH-групп пептидов и белков – 1,4-дитиоэритритола (в конечной концентрации модуляторов 5 мМ), позволил

получить оригинальные результаты исследования, уточняющие молекулярные механизмы про- и антиапоптотических эффектов изменения редокс-статуса опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии. А именно при нормоксии блокирование SH-групп пептидов и белков вызвало проапоптотический эффект, который был опосредован обратимой и необратимой окислительной модификацией протеинов, а при воздействии протектора SH-групп пептидов и белков и предшественника синтеза глутатиона активация гибели клеток сопряжена только с участием свободных SH-групп протеинов. В условиях гипоксии проапоптотический эффект при блокировании SH-групп пептидов и белков сопровождался увеличением содержания карбонилированных белков, при воздействии предшественника синтеза глутатиона – снижением концентрации белково-связанного глутатиона и карбонильных производных белков. Также в условиях гипоксии был получен антиапоптотический эффект при восстановлении SH-групп белков сопряженный со снижением глутатионилирования. Логически обоснованный выбор белков как биологических макромолекул в качестве мишеней модифицирующего действия активных форм кислорода, позволил получить приоритетные фундаментальные данные об участии глутатионилирования и карбонилирования протеинов в редокс-зависимых молекулярных механизмах опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии. Также установлены молекулярные мишени управления апоптотической гибелью опухолевых клеток – компоненты системы глутатиона.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Научно-практическая значимость диссертационной работы Орлова Д.С. представлена идентификацией патогенетических механизмов опухолевого роста и определением молекулярных мишеней для селективного управления процессом клеточной гибели. Установлено участие системы глутатиона и окислительной модификации белков в редокс-регуляции и реализации апоптоза опухолевых клеток линии P19 в условиях нормоксии, а также при гипоксии. Полученные автором результаты исследования представляют собой теоретическое обоснование роли изменения редокс-статуса опухолевых клеток в управлении апоптотической гибелью на молекулярном уровне как при нормоксии, так и в условиях гипоксии. Полученные фундаментальные знания обосновывают новые способы и подходы таргетной

регуляции и реализации апоптоза при развитии новообразований для проведения патогенетически обоснованной терапии и в превентивных целях.

Основные положения и выводы диссертации используются в учебном процессе на кафедрах патофизиологии, биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики Сибирского государственного медицинского университета.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

В научно-практическом плане результаты диссертационной работы Орлова Д.С. могут быть рекомендованы для широкого круга специалистов: патофизиологов, биохимиков, клеточных биологов, онкологов, областью научных интересов которых является редокс-регуляция метаболических процессов, в частности малигнизация клеток организма (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины (отдел общей патологии); Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Научно-исследовательский институт онкологии Томского НИМЦ, отдел экспериментальной онкологии); Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, (лаборатория механизмов гибели клеток, лаборатория клеточных основ развития злокачественных заболеваний).

Степень обоснованности научных положений работы и выводов

Диссертация представлена рукописью, написана в соответствии с ГОСТ Р 7.0.11-2011 на 148 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 5 рисунками, библиографический указатель включает 277 источников.

Автором диссертации четко определена цель исследования, заключающаяся в идентификации молекулярных механизмов участия окислительно-модифицированных белков и системы глутатиона в нарушении редокс-регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии *in vitro*. В соответствии с поставленной целью определены и основные задачи исследования.

Поставленную цель и задачи исследования Орлов Д.С. обосновывает анализом данных литературы о роли редокс-баланса и окислительной модификации белков в нарушении регуляции апоптоза опухолевых клеток в условиях гипоксии. В главе «Материал и методы исследования» подробно описаны объект, условия культивирования клеток и тесты *in vitro*, использованные автором современные методы исследования. Высокая степень достоверности полученных результатов обоснована достаточным объемом экспериментального материала, а также использованием в работе современных и высокотехнологичных молекулярно-биологических методов оценки параметров клетки. Полученные результаты подвергнуты статистической обработке с помощью современных методов доказательной медицины.

Третья глава посвящена полученным результатам исследования. Первый раздел главы содержит описание параметров регуляции и реализации апоптоза, изменения состояния системы глутатиона и окислительной модификации белков в изучаемых клетках в условиях нормоксии и гипоксии, второй подраздел главы посвящен описанию результатов влияния редокс-модуляторов на изучаемые параметры в опухолевых клетках при нормальном и сниженном напряжении кислорода. Результаты представлены в формате таблиц.

В четвертой главе диссертации выполнен анализ, полученных автором результатов исследования. Обсуждение собственных результатов сопряжено с анализом сведений современной научной литературы по изучаемым механизмам. Орловым Д.С. осуществлена разносторонняя комплексная оценка молекулярных механизмов, вовлеченных в изменение состояния системы глутатиона и нарушение регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19 в зависимости от напряжения кислорода и воздействия редокс-модуляторов. Глава иллюстрирована схемами, которые облегчают восприятие фактического материала.

На основании данных современной литературы и собственных результатов автор диссертации приходит к обоснованному заключению, что молекулярными мишенями для таргетного воздействия на апоптотическую гибель опухолевых клеток линии P19 в условиях нормоксии и гипоксии могут выступать компоненты системы глутатиона (восстановленная и окисленная форма глутатиона, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза) и регуляция обратимой и необратимой окислительной модификации белков. Представленные выводы полностью отражают суть проведенного

исследования. Результаты работы неоднократно докладывались на научных конференциях и изложены в достаточном количестве публикаций (17 работ, из них 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации, из них 1 – цитируемая в Web of Science и 1 – цитируемая в Scopus).

Представленная Орловым Д.С. диссертация удачно сочетает актуальность поставленной задачи, оригинальность результатов, полученных при использовании современных методов и подходов, а также интересную интерпретацию данных. Положения, выносимые на защиту, и выводы диссертации Орлова Д.С. отражают решение поставленных задач и базируются на результатах собственных исследований. Содержание и структура автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертационному исследованию нет.

При работе над диссертацией Орлова Д.С. появились вопросы уточняющего и дискуссионного характера:

1. Согласно дизайну проведенного Вами эксперимента, период культивирования клеток линии P19 в условиях модуляции редокс-статуса при нормоксии или гипоксии, составил 18 ч. Чем был обусловлен выбор этого срока? Какой сценарий развития Вы предполагаете при большем/меньшем времени культивирования?
2. На Ваш взгляд, являются ли обратимыми выявленные Вами изменения рецепторного и митохондриального путей апоптоза клеток линии P19, регистрируемые при нормоксии и моделировании гипоксии в условиях блокирования SH-групп пептидов и белков, при прекращении действия фактора?
3. Могут ли быть использованы установленные Вами особенности участия системы глутатиона в окислительной модификации белков, полученные на клеточной линии P19, при экстраполяции этих результатов на опухолевые линии клеток человека?
4. Как Вы считаете, выявленные Вами молекулярные механизмы редокс-зависимой регуляции и реализации апоптоза в опухолевых клетках линии P19 носят универсальный характер?

Заключение

Диссертация Орлова Дмитрия Сергеевича на соискание учёной степени кандидата медицинских наук является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи по идентификации механизмов участия компонентов системы

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»; 236041, Россия, Калининград, ул. А. Невского, 14; тел.: +7 (4012)59-55-95/6631; +7-911-482-0489; e-mail: LLitvinova@kantiana.ru

Сведения об официальном оппоненте
по защите диссертации Орлова Дмитрия Сергеевича
«Редокс-зависимые механизмы нарушения регуляции
апоптоза клеток линии Р19 при гипоксии»
на соискание учёной степени кандидата медицинских наук
по специальности 3.3.3. «Патологическая физиология»

Фамилия, Имя, Отчество	Литвинова Лариса Сергеевна
Год рождения; гражданство	1975; РФ
Учёная степень (с указанием шифра специальности, по которой защищена диссертация)	д-р мед наук 14.00.16 – патологическая физиология 03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология
Учёное звание	доцент
Основное место работы	
Почтовый индекс, адрес, телефон, электронная почта, официальный сайт	236041, г. Калининград, ул. Александра Невского, д. 14, Телефон +7 (4012) 59 55 95/6631, e-mail: post@kantiana.ru https://kantiana.ru
Полное наименование организации	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»
Наименование структурного подразделения	Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, кафедра фундаментальной медицины образовательно-научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)»
Должность	Директор, профессор
Список основных работ:	

1	Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Васильева О.А., Романова Е.В., Комар А.А., Литвинова Л.С., Полетика В.С., Чумакова С.П., Новицкий В.В. / Галектины 1 и 3 в механизмах рекрутирования эозинофильных гранулоцитов в опухолевую ткань при раке желудка и толстого кишечника // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2019. – Т. 74, № 5. – С. 317-322.
2	Skuratovskaia D., Komar A., Vulf M., Litvinova L. / Mitochondrial destiny in type 2 diabetes: the effects of oxidative stress on the dynamics and biogenesis of mitochondria // Peer J. – 2020. – V. 8. – P. e9741.
3	Pshenichnikov S., Omelyanchik A., Gazatova N., Malashchenko V., Khaziakhmatova O., Litvinova L., Panina L., Rodionova V., Levada K., Efremova M., Perov N., Lunova M., Peddis D., Lunov O. / Control of oxidative stress in Jurkat cells as a model of leukemia treatment // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. – 2021. – V. 523. – P. 167623.
4	Skuratovskaia D.S., Komar A., Vulf M., Shunkin E., Kirienkova E., Dakhnevich A., Malkov D., Zatolokin P., Litvinova L., Quang H.V. / Tumor necrosis receptor superfamily interact with fusion and fission of mitochondria of adipose tissue in obese patients without

	type 2 diabetes // Biomedicines. – 2021. – Т. 9, № 9. – P. 1260
5	Chumakova S., Urazova O., Vins M., Kolobovnikova Y., Churina E., Novitskiy V., Shipulin V., Pryakhin A., Sukhodolo I., Stelmashenko A., Litvinova L. / Galectin 3 and non-classical monocytes of blood as myocardial remodeling factors at ischemic cardiomyopathy // IJC Heart and Vasculature. – 2021. – V. 33. – P. 100766.
6	Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Malashchenko V.V., Todosenko N.M., Khlusov I.A., Daminova A.G., Litvinov R.I., Kudryavtseva V.L., Sukhorukov G.B., Popova V., Korotkova E.I., Weissman D., Atochina-Vasserman E.N., Gow A.J. / Human mesenchymal stem cells as a carrier for a cell-mediated drug delivery // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Т. 10. – C. 796111.
7	Кириенкова Е.В., Вульф М.А., Турсунов Р.М., Литвинова Л.С. / Патофизиология типовых патологических процессов // Калининград. – 2023. – 141 с.
8	Denisenko O.D., Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Lyapunova S.S., Litvinova L.S. / Morphological changes in erythrocytes of newborns after perinatal hypoxia // Cell and Tissue Biology. – 2023. – V. 17, № 6. – C. 682-691.
9	Todosenko N., Khaziakhmatova O., Malashchenko V., Yurova K., Bograya M., Beletskaya M., Vulf M., Gazatova N., Litvinova L. / Mitochondrial dysfunction associated with mtDNA in metabolic syndrome and obesity // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24, № 15. – C. 12012.
10	Litvinova L., Vulf M., Yurova K., Khaziakhmatova O., Malashchenko V., Bograya M., Kozlov I., Todosenko N. / Mitochondria and lipid droplets: focus on the molecular structure of contact sites in the pathogenesis of metabolic syndrome // Current Medicinal Chemistry. – 2024; doi: 10.2174/0109298673309247240610050423

Официальный оппонент

Л.С. Литвинова

Проректор по научной работе
и последипломной подготовке

О.С. Федорова

