

Минобрнауки России

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр Сибирского отделения
Российской академии наук»
(ФИЦ КНЦ СО РАН)

ул. Академгородок, д. 50, г. Красноярск, 660036
Телефон +7 (391) 243-45-12;
Факс +7 (391) 290-53-78
<http://ksc.krasn.ru>
e-mail: fic@ksc.krasn.ru

ОКПО 05239177 ОГРН 1022402133698
ИНН 2463002263 КПП 246301001

16-08-2025 № 325
На № _____ от _____

Утверждаю

Директор ФИЦ КНЦ СО РАН
член-корреспондент РАН,
д-р с.-х. наук

А.А. Шпедт

«16» сентября 2025

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертационной работы 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 выполненной работы

Одним из приоритетных направлений современной науки является изучение молекулярных механизмов, модулирующих запуск и регуляцию апоптоза при различных патологиях. На сегодняшний день злокачественные новообразования занимают одну из ведущих позиций среди социально-значимых патологий и являются причиной высокой смертности населения в различных возрастных категориях. Роль нарушений апоптотической гибели в патогенезе опухолевого роста является неоспоримой. Особый научный интерес представляет изучение реализации и регуляции клеточной гибели, сопряженной с модуляцией редокс-статуса опухолевых клеток и мощности окислительного стресса при различных значениях напряжения кислорода. В основе изменения функционирования опухолевых клеток при моделировании гипоксии лежит модуляция редокс-состояния митохондрий, обеспечивающих усиление генерации активных форм кислорода и активность окислительной модификации белков.

Модуляция конформационных изменений белков, отвечающих за регуляцию процессов гибели, является технологией управления активностью клеточного протеома на молекулярном уровне. Большой интерес

ФИЦ КНЦ СО РАН
Отдел диссертационных работ
Редуктор: 79 23.04 25

представляет возможность изменения функциональной активности белковых молекул посредством обратимой и необратимой ковалентной химической модификации (глутатионилирование и карбонилирование), а также роль в этом процессе системы глутатиона в условиях изменения напряжения кислорода внутри клетки. Однако молекулярные механизмы, обеспечивающие нарушение апоптоза на фоне изменения редокс-статуса опухолевых клеток в условиях гипоксии, до настоящего времени изучены недостаточно.

Таким образом, диссертационная работа Орлова Дмитрий Сергеевича, посвященная изучению молекулярных механизмов участия системы глутатиона, окислительно-модифицированных белков в нарушении редокс-регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии *in vitro*, является актуальной.

Связь темы с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Тематика диссертационной работы Орлова Д.С. соответствует современным направлениям в области патологической физиологии. Работа выполнена 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.), базе 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.).

Новизна исследования, полученных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В ходе проведенного исследования с помощью комплекса культуральных, биохимических и молекулярно-биологических методов проведена оценка уровня окислительного стресса, реализации и регуляции апоптоза, особенностей реагирования компонентов системы глутатиона и окислительной модификации белков в опухолевых клетках линии P19 (тератокарцинома мышцы СЗН/Не) при нормальном напряжении кислорода и в условиях моделирования гипоксии *in vitro*, а также в присутствии блокатора SH-групп пептидов и протеинов – N-этилмалеимида, предшественника синтеза глутатиона – N-ацетилцистеина и протектора SH-групп пептидов и белков – 1,4-дитиозэритритола при нормальном напряжении кислорода и в условиях моделирования гипоксии *in vitro*.

В диссертации представлены новые данные, доказывающие роль окислительной модификации белков (глутатионилирования и карбонилирования) в редокс-зависимой реализации и регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19, культивированных в условиях нормоксии и гипоксии. Автором 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.

Впервые показано, что 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. Также Орловым Д.С. установлено, что в условиях гипоксии действие N-этилмалеимида (блокатора SH-групп) в изучаемых клетках вызывало активацию апоптоза на фоне усиления 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 проведенной работе выявлены потенциальные молекулярные мишени управления апоптозом опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии – компоненты системы глутатиона (восстановленный и окисленный глутатион, глутатионредуктаза, тиоредоксинредуктаза).

Получены приоритетные данные о том, что глутатионилирование и карбонилирование белков представляют собой редокс-зависимые молекулярные механизмы регуляции апоптотической гибели опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии.

В целом, полнота исследования, использование современного методологического подхода и статистической обработки данных позволяют заключить, что полученные результаты и сформулированные 9 выводов являются доказанными и достоверными, а положения, выносимые на защиту, вполне обоснованными.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

В диссертационной работе представлены новые знания, расширяющие представления о патогенезе опухолевого роста в условиях гипоксии. Данные о роли системы глутатиона и окислительной модификации белков в процессе реализации и регуляции программированной гибели опухолевых клеток линии P19 при нормальном напряжении кислорода и гипоксии необходимы для расширения представлений о молекулярных механизмах канцерогенеза. Полученные результаты фундаментального характера о механизмах редокс-зависимой регуляции клеточной гибели в условиях окислительного стресса, индуцированного низким напряжением кислорода в опухолевых клетках линии P19, могут стать основой для разработки способов регуляции и реализации апоптотической клеточной гибели при патологиях, сопровождающихся формированием гипоксии.

Несомненный научный и практический интерес имеют данные о том, что молекулярными мишенями для таргетного воздействия на регуляцию апоптоза опухолевых клеток могут выступать компоненты системы глутатиона и окислительная модификация белков как при нормоксии, так и при гипоксии. При этом полученные результаты обосновывают одну из молекулярных технологий регуляции апоптоза при опухолевой прогрессии в условиях гипоксии – ковалентную модификацию белков с помощью глутатионилирования и карбонилирования.

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в образовательном процессе кафедры патофизиологии, кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты исследования могут быть положены в основу разработки методов таргетного управления апоптоза опухолевых клеток на фоне развития окислительного стресса при нормоксии и в условиях гипоксии.

Материалы исследования могут быть рекомендованы специалистам для проведения лекций, семинаров, практических занятий по патологической физиологии, биологической химии, онкологии для студентов, ординаторов и слушателей курсов повышения квалификации на профильных кафедрах медицинских вузов.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Орлова Д.С. оформлена в соответствии с ГОСТ Р 7.0.11-2011, изложена на 148 страницах машинописного текста, написана в традиционном стиле и состоит из введения, глав, содержащих обзор литературы, характеристику материала и методов исследования,

результаты собственных исследований и их обсуждение, выводов. Библиографический указатель содержит 277 источников, из них 22 отечественных и 255 зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 5 рисунками и 19 таблицами.

Во введении автор обосновывает актуальность темы исследования, ее научную новизну, практическую и теоретическую значимость, формулирует цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту. Цель работы сформулирована четко, задачи соответствуют поставленной цели. Положения, выносимые на защиту, отражают полученные автором новые научные результаты.

В главе «Обзор литературы» автором освещены вопросы, касающиеся современных представлений о роли редокс-статуса и окислительной модификации белков в нарушении регуляции апоптоза опухолевых клеток в условиях гипоксии. Обзор литературы изложен достаточно полно и охватывает различные аспекты современного состояния изучаемой проблемы, написан понятным, легко воспринимаемым языком. В конце данной главы представлено заключение, которое подчеркивает необходимость проведения данного исследования. Изложенный в обзоре литературы материал позволяет судить о новизне результатов, полученных автором.

Глава «Материал и методы исследования» содержит краткую характеристику объекта (опухолевые клетки линии Р19 (тератокарцинома мыши СЗН/Не)) исследования, условия моделирования экспериментальных процессов. Методы исследования и статистическая обработка, полученных результатов, описаны подробно и логично. Необходимо отметить высокий методический уровень работы. Автором использованы адекватные методы статистического анализа результатов исследования.

Глава «Результаты исследования» содержит полученные в ходе выполнения исследования фактические данные, которые представлены в виде таблиц. Проведена оценка параметров регуляции и реализации апоптоза, окислительного стресса, состояния системы глутатиона и окислительной модификации белков в опухолевых клетках линии Р19 при нормоксии и гипоксии, а также при применении редокс-модуляторов N-этилмалеимида или 1,4-дитиозэритритола, или N-ацетилцистеина.

Анализ полученных результатов исследования представлен в главе «Обсуждение результатов» достаточно полно, логично и последовательно, со знанием современного состояния вопроса. В заключении Орлов Д.С. подводит итоги проведенного исследования. Интерес представляют схемы, характеризующие влияние редокс-модуляторов на реализацию и регуляцию

путей программированной клеточной гибели, компоненты системы глутатиона и окислительную модификацию белков опухолевых клеток линии P19 в условиях нормоксии и гипоксии. Наряду с этим, в заключении диссертационной работы автор представил схему, описывающую молекулярные механизмы участия системы глутатиона и окислительной модификации белков в нарушении регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19 в условиях моделирования гипоксии. Вышеизложенное обуславливает научную новизну проведенного исследования. Опираясь на полученные результаты и литературные данные, Орлову Д.С. удалось решить поставленные задачи и достичь цели диссертационного исследования.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Достоверность и обоснованность основных положений и выводов, сформулированных в диссертации Орлова Д.С., не вызывают сомнений.

Диссертационная работа выполнена на достаточном экспериментальном материале, тщательно продуман дизайн исследования, использованы современные высокотехнологичные молекулярно-биологические методы (культуральные, тесты *in vitro*, спектрофотометрические, цитофлюориметрические методы). Для обработки результатов использованы адекватные методы математической статистики. Вышеуказанное обеспечивает высокий методический уровень работы.

Выполненная диссертационная работа Орлова Д.С. соответствует паспорту специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Апробация результатов диссертационной работы

Основные положения диссертации Орлова Д.С. неоднократно докладывались и обсуждались на всероссийских и международных научно-практических конференциях за период с 2015 по 2023 г.г. Результаты исследования опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации (5 статей), из них 1 – цитируемая в Web of Science и 1 – цитируемая в Scopus. Публикации в полной мере отражают основные результаты диссертационного исследования.

Соответствие автореферата содержанию диссертации

Диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, автореферат в полной мере отражает ее основное содержание и включает все основные положения и выводы, а также содержит список опубликованных работ по теме диссертации.

Принципиальных замечаний по содержанию, изложению результатов и оформлению диссертационной работы Орлова Д.С. нет.

В целом работа, безусловно, заслуживает положительной оценки, однако есть ряд вопросов:

1. Одним из ключевых направлений диссертационной работы является исследование окислительного стресса в опухолевых клетках на фоне гипоксии. В частности, в разделе 3.1, в таблице 6 и ее описании приводятся результаты, показывающие значительное увеличение содержания АФК и ОН-радикала в опухолевых клетках линии Р19. Каков механизм развития окислительного стресса в клетках при гипоксии? Откуда клетки берут кислород в условиях гипоксии для развития окислительного стресса?

2. В ряде случаев при нормоксии блокатор и протектор тиоловых групп действует одинаково. Например, в разделе 3.2, в таблице 11 и ее описании представлено, что процент МТТ-положительных клеток снижается в условиях нормоксии при добавлении NEM и DTE. В таблице 14 показано, что процент TNF RI⁺ и Fas⁺ повышается при действии блокаторов и протекторов тиоловых групп в условиях нормоксии. Почему отсутствуют различия в результате воздействия на опухолевые клетки веществ с противоположным механизмом действия?

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Орлова Дмитрия Сергеевича «Редокс-зависимые механизмы нарушения регуляции апоптоза клеток линии Р19 при гипоксии», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 3.3.3. Патологическая физиология, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной для патологической физиологии научной задачи – установление молекулярных механизмов участия окислительно-модифицированных белков и системы глутатиона в нарушении редокс-регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Р19 при нормоксии и гипоксии *in vitro*.

По актуальности темы, полноте изложения, методическому уровню и объему проведенных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости работы, количеству публикаций, представленная к защите диссертационная работа Орлова Дмитрия Сергеевича «Редокс-зависимые механизмы нарушения регуляции апоптоза клеток линии Р19 при гипоксии» полностью отвечает критериям пункта 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. от 25.01.2024 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор Орлов Дмитрий Сергеевич заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки).

Отзыв рассмотрен и утвержден на межлабораторном семинаре Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) от 10.04.2025, протокол № 4.

Ведущая организация дала согласие на сбор, обработку, хранение и размещение в сети «Интернет» своих персональных данных (в соответствии с Приказом Минобрнауки России №1 от 9 января 2020 г.), необходимых для работы диссертационного совета 21.2.068.01.

Отзыв составил:

Заведующий лабораторией
клеточно-молекулярной физиологии и
патологии федерального исследовательского центра
«Красноярский научный центр Сибирского отделения
Российской академии наук»
Научно-исследовательского института
медицинских проблем Севера,
доктор медицинских наук, профессор

Андрей Анатольевич Савченко

16.04.2025



Сведения об авторе отзыва:

Савченко Андрей Анатольевич, доктор медицинских наук (14.03.03 – патологическая физиология), профессор по специальности Патологическая физиология, заведующий лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера; 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, <http://ksc.krasn.ru>, e-mail: fic@ksc.krasn.ru, телефоны: +7 (391) 243-45-12 (раб.); 8-905-971-37-15 (моб.).

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

в аттестационное дело Орлова Дмитрия Сергеевича

Диссертация на тему «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».

Полное название ведущей организации	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»
Фамилия Имя Отчество, учёная степень, учёное звание руководителя организации	Шпедт Александр Артурович – член-корреспондент РАН, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, директор
Фамилия Имя Отчество, учёная степень, учёное звание заместителя руководителя организации	Каспаров Эдуард Вильямович – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», директор Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера
Фамилия Имя Отчество, учёная степень, учёное звание, должность сотрудника, который подготовит отзыв ведущей организации	Савченко Андрей Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера

Адрес ведущей организации

индекс	660036
объект	ФИЦ КНЦ СО РАН
город	Красноярск
улица	ул. Академгородок
дом	50
телефон	+7 (391) 243-45-12
e-mail	fic@ksc.krasn.ru
Web-сайт	http://ksc.krasn.ru

Ведущая организация подтверждает, что согласно требованию п. 24 Положения о присуждении учёных степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842:

1. соискатель учёной степени, научные руководители (научные консультанты) не работают в ведущей организации;
2. в ведущей организации не ведутся научно-исследовательские работы, по которым соискатель учёной степени является руководителем или работником организации-заказчика или исполнителем (соисполнителем).

Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние пять лет:

1. The distribution of B16 melanoma cells in cell-cycle phases under the influence of dacarbazine / Lapkina E.Z., Esimbekova A.R., Beleniuk V.D., Savchenko A.A., Ruksha T.G. // Cell and Tissue Biology. 2023. T. 17. № 2. С. 161-168.
2. Субпопуляционный состав НК-клеток крови у больных гепатитом С с 1-М или 3-М генотипом / Цуканов В.В., Черепнин М.А., Савченко А.А., Васютин А.В., Каспаров Э.В., Борисов А.Г., Беленюк В.Д., Тонких Ю.Л. // Медицинский совет. 2023. Т. 17. № 18. С. 44-51.
3. Выраженность окислительного стресса и энзиматическая активность нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза / Дудина М.А., Догадин С.А., Савченко А.А., Гвоздев И.И. // Атеросклероз. 2022. Т. 18. № 4. С. 411-414.
4. Эффективность детоксикации для коррекции системного воспалительного ответа при иммунореабилитации онкологических больных / Савченко А.А., Каспаров Э.В., Борисов С.А., Мастерова А.А., Борисов А.Г. // Цитокины и воспаление. 2022. Т. 19. № 1-4. С. 61-68.
5. Распределение клеток меланомы В16 по фазам клеточного цикла под воздействием дакарбазина / Лапкина Е.З., Есимбекова А.Р., Беленюк В.Д., Савченко А.А., Рукша Т.Г. // Цитология. 2022. Т. 64. № 6. С. 573-580.
6. Focal adhesion alterations in G0-positive melanoma cells / Esimbekova A.R., Palkina N.V., Zinchenko I.S., Belenyuk V.D., Savchenko A.A., Sergeeva E.Yu., Ruksha T.G. // Cancer Medicine. 2022. С. 1-15.
7. Особенности продукции активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами в формировании недостаточного ответа на ацетилсалициловую кислоту у пациентов с ишемической болезнью сердца после операции коронарного шунтирования / Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А. // Трансляционная медицина. 2022. Т. 9. № 1. С. 12-28.
8. Изменение продукции активных форм кислорода тромбоцитами в генезе их недостаточного ответа на антитромбоцитарную терапию при коронарной реваскуляризации / Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Косинова А.А. // Атеросклероз. 2021. Т. 17. № 3. С. 61-62.
9. Хемилюминесцентная активность и агрегация тромбоцитов при хронической коронарной болезни сердца на фоне терапии ацетилсалициловой кислотой до и после коронарного шунтирования / Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Косинова А.А. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2021. Т. 65. № 1. С. 42-51.
10. Transcriptomic profiling revealed plexin A2 downregulation with migration and invasion alteration in dacarbazine-treated primary melanoma cells / Tyumentseva A., Averchuk A., Palkina N., Zinchenko I., Ruksha T., Moshev A., Savchenko A. // Frontiers in Oncology. 2021. Т. 11. № APR. С. 732501.
11. FOXO1-опосредованное влияние микроРНК MIR-204-5P на пролиферацию клеток меланомы / Дубовцева И.Ю., Аксененко М.Б., Николаева Е.Д., Аверчук А.С., Мошев А.В., Савченко А.А., Маркова С.В., Рукша Т.Г. // Молекулярная биология. 2021. Т. 55. № 4. С. 667-675.
12. Изменение субпопуляционного состава и фагоцитарной активности моноцитов у больных раком почки при воздействии метаболитов in vitro / Савченко А.А., Борисов А.Г., Беленюк В.Д., Мошев А.В. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т. 171. № 3. С. 344-348.
13. Анализ синтеза активных форм кислорода тромбоцитами больных ишемической болезнью сердца с помощью хемилюминесцентного метода / Савченко А.А., Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Гвоздев И.И., Монгуш Т.С., Косинова А.А. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т. 169. № 4. С. 525-528.

Директор ФИЦ КНЦ СО РАН
член-корреспондент РАН
д-р с.-х. наук, профессор



А.А. Шпедт