

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Бирюкова Михаила Михайловича

«Молекулярные каскады, определяющие селективность цитотоксического действия холодной плазмы атмосферного давления в отношении опухолевых клеток»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальности 1.5.4 – биохимия

Актуальность исследования

Современная терапия онкологических заболеваний, как правило, основана на комбинации различных методов воздействия на опухолевые клетки для достижения наилучшего результата. Каждый из этих методов имеет свои существенные ограничения и серьезные побочные эффекты, дополнительные сложности создает способность опухолевых клеток вырабатывать резистентность. Все эти факторы стимулируют активные исследования, направленные на совершенствование существующих подходов или создание новых. Важную роль в терапии онкологических заболеваний играют методы физического воздействия, прежде всего, лучевая терапия. В качестве более безопасной и, возможно, более селективной терапии в последнее время рассматривается применение холодной плазмы, одним из возможных преимуществ которой является и способность воздействовать на ткани на относительно небольшой глубине, что может способствовать меньшей степени поражения здоровых тканей. Несмотря на уже продемонстрированную эффективность и практическую реализуемость этого подхода, его дальнейшие разработка и внедрение сдерживаются недостаточной изученностью механизмов воздействия холодной плазмы на ткани, как опухолевой природы, так и здоровые, и, соответственно, сложностью адаптации под конкретные типы опухолей и выработки подходов для контроля побочных эффектов. Кроме того, понимание механизмов цитотоксического действия будет способствовать рациональному подбору препаратов для комплексной противоопухолевой терапии с использованием холодной плазмы в качестве одного из компонентов воздействия. В связи с вышесказанным, тема диссертационной работы Бирюкова Михаила Михайловича, направленной на изучение механизмов цитотоксического действия холодной плазмы (в технологии холодной плазменной струи (ХПС)) в отношении опухолевых и здоровых клеток с целью выявления причин более выраженного цитотоксического действия в отношении именно опухолевых клеток, безусловно, является важной и актуальной.

Объем и структура работы.

Диссертационная работа изложена на 197 страницах, включая два приложения, в которых приведены состав потока холодной плазменной струи, используемой в

экспериментальной части работы для воздействия на биомембраны (Приложение А) и дополнительные таблицы к разделу, посвященному изучению влияния ХПС на транскриптом (Приложение Б). Работа построена традиционным способом и состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, главы, посвященной обсуждению результатов, заключения и выводов, а также списка цитируемой литературы, насчитывающего 300 источников.

Литературный обзор охватывает сразу несколько взаимосвязанных тем, включая: принципы генерации холодной плазмы; описание активных форм кислорода и азота, присутствующих в клетках, и антиоксидантных систем клеток, противостоящих разрушительным эффектам этих активных форм; методы качественного и количественного определения активных форм кислорода и азота; описание активных форм кислорода и азота, генерируемых в потоке холодной плазмы; анализ имеющейся информации по молекулярным механизмам ответа опухолевых клеток на обработку холодной плазмой, а также обсуждение отличий опухолевых и нетрансформированных клеток, которые могут обуславливать их различную чувствительность к активным формам кислорода и азота. Такой подход к написанию литературного обзора позволил охватить практически все важные для диссертационного исследования темы и очень удобен для введения читателя в курс достижений в этой области и имеющихся проблем. Несмотря на значительный объем литературного обзора (около 50 страниц), он не кажется избыточным.

В **экспериментальной части** описываются методы исследований и приводятся данные, необходимые для анализа полученных автором результатов и проверки их достоверности. Высокая достоверность полученных результатов и выводов обоснована применением комплекса современных научных экспериментальных и расчетных подходов.

В главе **«Результаты и обсуждение»** приведены описание и анализ основных результатов, полученных автором.

На первом этапе автором были определены условия генерации ХПС и обработки, обеспечивающих преимущественную гибель опухолевых клеток. С использованием этих условий были проведены исследования, направленные на изучение динамики внутриклеточных и внеклеточных активных форм кислорода и азота (АФКА) после воздействия ХПС. Продемонстрировано, что в опухолевых клетках дольше сохраняется повышенное содержание АФКА, что приводит к более долгому нахождению клеток в состоянии окислительного стресса, по сравнению с неопухолевыми клетками. Большой объем работы проведен в рамках изучения изменения транскриптомов опухолевых и

здоровых клеток после обработки ХПС через разные временные промежутки – 3 и 24 часа. Показано, что обработка ХПС на ранних стадиях ответа приводит к активации аналогичных генов-регуляторов в опухолевых и здоровых клетках, однако уровень транскрипционного ответа в опухолевых клетках был значительно выше такового, наблюдавшегося в здоровых клетках. Важной особенностью ответа именно опухолевых клеток была активация экспрессии генов, вовлеченных в ответ на стресс эндоплазматического ретикулума. На основании полученных данных сделано предположение, что разная чувствительность здоровых и опухолевых клеток к индуцированному ХПС окислительному стрессу связана с повышенным базовым уровнем АФКА в последних, что приводит к более быстрому истощению возможностей антиоксидантных систем опухолевых клеток противостоять окислительному стрессу. Предположено, что вторичные АФКА, с нейтрализацией которых не справляется антиоксидантная система опухолевых клеток, ответственны за окислительные повреждения белков, инициацию стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и последующей клеточной гибели, преимущественно по пути апоптоза.

Бирюковым М. М. осуществлен выбор параметров ХПС, позволивший проводить воздействие *in vivo* без риска термического ожога и термического воздействия на опухолевые клетки. С использованием этих параметров была оценена противоопухолевая эффективность ХПС на мышах с трансплантированными подкожно клетками меланомы мыши В16. Показано, что обработка ХПС позволяет достоверно снизить объем опухоли на 10-й день после первой обработки по сравнению с контролем, что подтверждает практическую перспективность изучаемого подхода. Следует отметить, что масса мышей в группе ХПС была заметно ниже, чем в контрольной группе, что может свидетельствовать о возможных побочных эффектах применения ХПС, этот эффект заслуживает отдельного изучения.

Заключение и выводы обобщают полученные результаты и полностью подтверждаются приведенными данными.

Научная новизна и практическая значимость результатов связаны, прежде всего, с впервые проведенным комплексным исследованием молекулярных механизмов ответа опухолевых и неопухолевых клеток человека на обработку ХПС, что позволило обосновано предположить причину наблюдаемых различий в чувствительности опухолевых и неопухолевых клеток к такой обработке. Полученные данные могут служить и основой для подбора препаратов для комплексной терапии, включающей и обработку ХПС, и воздействие химиопрепаратами на выявленные сигнальные пути. Практическая перспективность изучаемого подхода подтверждена в эксперименте *in vivo*.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность результатов обусловлена применением комплекса современных методов исследования и не вызывает сомнений. Выводы обоснованы и полностью основаны на полученных данных. Основные результаты исследований приведены в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и были представлены на 10 конференциях.

Публикации полностью отражают основное содержание диссертации. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертации. Работа хорошо написана, легко читается и содержит минимальное количество опечаток и неудачных выражений.

Замечания

Работа лишена принципиальных недостатков, тем не менее, при прочтении возникли следующие вопросы:

1. Во введении написано, что НЕК-293Т представляют собой «клетки надпочечников эмбриона человека», что не совсем так, эти трансформированные под воздействием аденовируса клетки весьма далеки от нормальных клеток надпочечников эмбриона человека, хотя и, действительно, не являются опухолевыми и часто рассматриваются в качестве модельных условно-здоровых клеток.
2. Описание эксперимента *in vivo* в экспериментальной части слишком лаконично и не содержит многих важных деталей, например, подробного описания схемы эксперимента, вывода животных из эксперимента и т.п.
3. В разделе 3.3.2 приведено обсуждение отличий в транскриптомах клеточных линий A-549 и здоровых фибробластов легкого Wi-38, в частности, данных, приведенных в Таблице 6. При этом обсуждены все приведенные в таблице гены, за исключением гена *GPI*. С чем связано такое невнимание к этому гену?
4. Учитывая важность системы репарации ДНК в устранении повреждений, в том числе, возникающих в результате окислительного стресса, возможно, имело бы смысл включить в обсуждение различий в экспрессии и гены, кодирующие ферменты системы репарации ДНК.
5. Приведенная на стр. 144 схема эксперимента *in vivo* включала повторную обработку ХПС с 15-гл по 17-ый дни эксперимента, и дальнейшее проведение эксперимента до 24-ого дня. Однако, все данные, приведенные на рис. 53 и обсуждаемые в тексте диссертации, ограничиваются 15-ю днями. Что наблюдалось дальше? Или схема эксперимента была скорректирована? На какой день эксперимента были определены массы животных и их органов?

Видно, что все приведенные выше замечания носят технический или дискуссионный характер и не затрагивают существа работы.

Заключение

Представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук диссертация Бирюкова Михаила Михайловича выполнена на высоком научном уровне и является завершенной научно-квалификационной работой, в которой решена важная задача по определению причин, определяющих селективность цитотоксического действия ХПС в отношении опухолевых клеток в сравнении с неопухолевыми.

Диссертационная работа Бирюкова М. М. полностью соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а её автор, Бирюков Михаил Михайлович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, доктор химических наук, профессор РАН, E-mail: volcho@nioch.nsc.ru; тел. +7 (383) 3308870



Волчо Константин Петрович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НАОХ СО РАН)

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 9, Новосибирский институт органической химии СО РАН

Контактный телефон НАОХ СО РАН: (383)330-88-50; факс (383)330-97-52; E-mail: benzol@nioch.nsc.ru; адрес официального сайта: <http://web.nioch.nsc.ru/nioch/>

Подпись Волчо К.П. заверяю:

Ученый секретарь НАОХ СО РАН,
кандидат химических наук

12.09.2025



Бредихин Роман Андреевич