

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Бирюкова Михаила Михайловича «Молекулярные каскады, определяющие селективность цитотоксического действия холодной плазмы атмосферного давления в отношении опухолевых клеток»** представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

Диссертационная работа Бирюкова М. М. посвящена поиску ключевых молекулярных каскадов, определяющих селективность цитотоксического действия холодной плазмы в отношении опухолевых клеток.

С увеличением общей продолжительности жизни человека онкологические заболевания выходят на первый план среди ведущих причин смертности в мире. Несмотря на прогресс в разработке таргетных подходов, основу противоопухолевой терапии до сих пор составляют традиционные методы химио- и лучевой терапии, которые зачастую обладают низкой селективностью, повреждая наряду с опухолевыми и здоровые ткани, что приводит к тяжелым системным побочным эффектам и ограничивает допустимые дозы. Это создает насущную потребность в разработке новых, более избирательных и менее инвазивных терапевтических стратегий. В последнее десятилетие внимание в этой области привлекает использование холодной плазменной струи (ХПС) — потока частично ионизированного газа, генерируемого при атмосферном давлении и комнатной температуре. Терапия ХПС продемонстрировала выдающийся противоопухолевый потенциал в доклинических исследованиях. Ключевым и наиболее интригующим свойством ХПС является ее селективная цитотоксичность: многочисленные эксперименты *in vitro* и *in vivo* показывают, что такое воздействие эффективно индуцирует гибель клеток злокачественных опухолей разных типов, в то время как нормальные клетки проявляют заметно более высокую устойчивость. Известно, что биологические эффекты ХПС опосредованы сложной смесью активных форм кислорода и азота, УФ-излучением и электрическими полями, однако первичный механизм, лежащий в основе избирательного действия ХПС, остается нерасшифрованным. Таким образом, актуальность работы Бирюкова М. М. как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Бирюкова М. М. состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы (которому дано самостоятельное название «Холодная плазма и биохимические основы ее противоопухолевого действия»), экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, насчитывающего 300 наименований. Работа содержит 180 страниц, 54 рисунка и 12 таблиц. Дополнительно в работе имеется 2 приложения общим объемом 17 стр.

Обзор литературы дает достаточно подробную информацию об активных формах кислорода и азота, их биохимических функциях в клетке, аналитических методах их определения, клеточных антиоксидантных системах, принципах генерации ХПС и активных форм кислорода и азота в холодной плазме. Подробно освещены существующие литературные данные о молекулярных механизмах действия ХПС на клетки, начиная с сигнальных путей, активируемых реакционноспособными радикалами в составе плазмы и заканчивая анализом молекулярных процессов, которые могли бы объяснять селективность действия ХПС в отношении опухолевых клеток. Дана сводка исследований по применению ХПС для действия на опухоли в моделях экспериментальных животных. В целом литературный обзор отвечает поставленным задачам, хотя в нем стоило бы более подробно осветить и данные о действии компонентов ХПС, отличных от активных форм кислорода и азота (электромагнитного излучения и электрических полей), которые также могут воздействовать на клетки.

Глава «Экспериментальная часть» содержит описание материалов, оборудования и современных биохимических и молекулярно-биологических методов, использованных в работе. Вся работа основана на применении генератора ХПС, разработанного в Институте физики полупроводников и Институте теоретической и прикладной механики СО РАН, поэтому в данной главе приведено краткое описание прибора, а в приложении А дана более подробная характеристика параметров плазмы, генерируемой в разных режимах. Методы исследования описаны с достаточной степенью детализации, и к этому разделу мало замечаний, за исключением того, что в нем можно было бы привести данные, которые в диссертации вынесены в приложения (например, таблицы А.1, Б.1, Б.2). В таблице 4 корректнее было бы говорить не о «культурах клеток», а о клеточных линиях. При проведении электрофореза по Лэммли (разд. 2.2.12), очевидно, напряжение было не 110 или 150 В/см, а 110 или 150 В.

Раздел диссертационной работы «Результаты и обсуждение» разделен на пять частей (в качестве небольшого замечания следует отметить, что в разделе сбита нумерация — после части 3.4 следует часть 3.6, следов части 3.5 обнаружить не удалось). В первой из них проведена оптимизация параметров ХПС, обеспечивающих максимально селективное действие обработки на культивируемые клетки человека, принадлежащие к клеточным линиям, происходящим из нескольких типов опухолей, по сравнению с условно нормальными фибробластами легочной ткани. Во второй части соискатель анализирует динамику внутри- и внеклеточных активных форм кислорода и азота, а также продуктов окисления клеточных мембран, после воздействия ХПС. Третья часть работы посвящена транскриптому нормальных и опухолевых клеток и его изменениям под действием ХПС. По результатам этой

части впервые предлагаются молекулярные процессы, на которые воздействует такая обработка. Более подробно эти процессы — регуляция клеточного цикла, ответ на повреждение ДНК и стресс эндоплазматической сети — исследуются в четвертой части, самой объемной из всех разделов результатов. Наконец, в последней части сделана попытка применить ХПС для обработки опухолей, привитых мышам в эксперименте *in vivo*. В работе привлекает большое число использованных разнообразных методов, а также тщательно поставленные контрольные эксперименты, что, к сожалению, далеко не всегда характерно для данной области исследований.

В ходе работы соискателем установлены условия, в которых обработка ХПС (на конкретном приборе) вызывает селективную гибель опухолевых клеток. Показано, что динамика концентраций активных форм кислорода и азота вне клеток и внутри них после воздействия ХПС отражает генерацию вторичных активных форм в водной среде, а не обусловлена первичными процессами ионизации в струе плазмы. Продemonстрировано, что в опухолевых клетках пути анаболических процессов, нейтрализации активных форм кислорода и азота и репарации окислительных повреждений биомолекул активируются под действием ХПС в большей степени, чем в нормальных клетках. Установлено, что в условиях, индуцирующих селективную гибель опухолевых клеток, в геноме возникает большое количество повреждений ДНК, которые, однако, эффективно подвергаются репарации. *In vitro* продемонстрирована возможность усиления цитотоксичности ХПС при ингибировании аутофагии, которая является ранним ответом на обработку ХПС. Наконец, показано торможение роста перевитых опухолей у экспериментальных животных при обработке ХПС. Интерпретация экспериментальных результатов, предложенная автором, во всех случаях представляется вполне аргументированной.

Замечания к работе немногочисленны. Так, соискателю следовало бы более тщательно обосновать выбор использованных клеточных линий: условно нормальные клетки Wi-38 и MRC-5 имеют мезодермальное происхождение, а сравниваемые с ними клетки A-549 и другие опухолевые клеточные линии — эпителиальное, что может значительно влиять на транскриптом и в целом на физиологию клетки. Возможно, лучшим вариантом для сравнения были бы клетки бронхиального эпителия человека (HSAEC), разные варианты которых доступны и широко используются в исследованиях нормальной и патологической физиологии респираторной системы. В части, посвященной транскриптному анализу, более информативным было бы представление данных не в виде диаграмм Венна и сложно читаемых графов генных сетей, а в виде «вулканного графика» с выделением генов, дающих максимальные различия, либо использование всех этих типов визуализации данных. Достаточно странно выглядят результаты эксперимента с подсчетом ДНК-комет (раздел

3.4.3.1, рис. 32): судя по представленным результатам, клетки с таким количеством разрывов, которые вносятся даже после 30 с воздействия ХПС, выживать вообще не должны, хотя, например, рис. 14 показывает выживаемость около 80%. Возможно, в качестве контроля здесь лучше было бы использовать не H_2O_2 и блеомицин, а рентгеновское или γ -излучение, для которых существуют надежно верифицированные методы пересчета дозы излучения в число двуцепочечных разрывов. Вдобавок оси на рис. 32Г и рис. 32Д неверно подписаны оси абсцисс (обработка ХПС в этих случаях не проводилась). С осторожностью следует интерпретировать результаты экспериментов по совместному использованию ХПС и хлорохина *in vivo* (разд. 3.6.3): хорошо известно, что объем распределения хлорохина очень велик из-за секвестрирования в тканях, в особенности в жировой ткани, и вполне возможно, что в опухоли просто не достигалась необходимая концентрация лекарства. Без анализа распределения хлорохина по организму нельзя утверждать, что его эффект *in vivo* отсутствует. Наконец, учитывая значительный объем разнородной информации и предположений о механизмах действия ХПС в литературе, в заключении работы более чем уместно было бы более развернутое сравнение результатов соискателя с результатами других исследователей, особенно в отношении того, какая часть отличий может быть вызвана различиями между использованными генераторами ХПС и параметрами плазмы, а также того, какие возможные механизмы действия ХПС следовало бы отвергнуть на основе новых результатов.

Сделанные замечания не умаляют достоинств работы и не влияют на основные выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнения. Работа Бирюкова М. М. выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. Результаты опубликованы в 4 статьях в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованных автором работ по данной теме.

Работа Бирюкова М. М. является завершенной в целом научно-квалификационной работой, в которой решена задача раскрытия молекулярных каскадов селективности действия холодной плазменной струи, имеющая существенное фундаментальное значение для понимания уязвимостей раковых клеток, их отличий в редокс-гомеостазе, механизмах репарации ДНК и сигнальных путях клеточной гибели по сравнению с нормальными клетками. С прикладной стороны результаты работы внесут заметный вклад в трансляцию ХПС-терапии из лаборатории в клиническую практику в качестве нового высокоэффективного и малотоксичного метода лечения онкологических заболеваний.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, установленным Институтом химической биологии и

фундаментальной медицины СО РАН для диссертаций, представленных на соискание ученой степени кандидата наук, а также критериям, определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации Бирюков Михаил Михайлович, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Главный научный сотрудник, заведующий лабораторией геномной и белковой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), доктор биологических наук, доцент, академик РАН


Жарков Дмитрий Олегович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Адрес: 630090, Новосибирская область, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Телефон: (383) 363-51-50

Факс: (383) 363-51-53

Эл. адрес: niboch@niboch.nsc.ru

Подпись Жаркова Дмитрия Олеговича заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, к. б. н.


Логашенко Е. Б.

16 сентября 2025 г.

