

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Мельниковой Анжелики Александровны
«Оценка влияния ионизирующих излучений и антибиотика
антрациклинового ряда доксорубицина в отношении клеточных линий
опухолевого и нормального происхождения *in vitro*», представленной на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.1. Радиобиология

Одним из существенных достижений в лечении онкологических заболеваний с применением ионизирующих излучений является развитие методов андронной терапии. Последняя по ряду характеристик превосходит терапию фотонами (пик Брэгга, высокие значения линейной передачи энергии и относительной биологической эффективности), что позволяет максимально прицельно воздействовать на глубоко расположенную или радиорезистентную опухоль, и при этом минимизировать дозовую нагрузку на здоровые ткани. Тем не менее, эффективность лечения во многом зависит от исходной чувствительности злокачественных клеток к повреждающему действию ионизирующего излучения, которая определяется как происхождением опухоли, так и индивидуальными особенностями пациентов (при одних и тех же локализации и гистологических характеристиках новообразования). Использование радиосенсибилизаторов - один из подходов к улучшению результатов лучевой терапии злокачественных новообразований. Однако последнее невозможно без изучения молекулярных механизмов радиочувствительности/радиорезистентности опухолевых клеток. Это является фундаментальной базой для развития персонализированного подхода к лечению рассматриваемых патологий. Однако сведения о сложных молекулярных сигнальных путях ответа малигнизированной клетки на повреждающее действие корпускулярного излучения и химиотерапевтических агентов (при их отдельном и комбинированном применении) недостаточны. Настоящая работа как раз посвящена комплексному изучению эффектов воздействия ионизирующего излучения

С отзывом ознакомлена Мельникова А.

12.06.2026

ВХОД № 2316
ДАТА 08.05.2026
КОЛ-ВО ЛИСТОВ: 10
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

разных видов и химиопрепарата доксорубицина на опухолевые и нормальные клетки *in vitro* с включением в исследование анализа экспрессии генов, ассоциированных с апоптозом. В связи с вышесказанным, несомненно, тема диссертации Мельниковой А.А. представляется крайне **актуальной**. Важность таких исследований согласуется с положениями Научно-технической программы РФ и Указом Президента РФ № 356 от 25 июля 2019 г. «О мерах по развитию синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры в Российской Федерации».

Новизна исследований и полученных результатов обусловлена применением комплексного методологического подхода к оценке повреждающего действия ионизирующего излучения разного качества (γ -излучение, ионы ^{12}C , протоны) на пять клеточных линий (hTERT, MCF-7, SK-N-BE(2), HeLa, HUH-7) различного гистогенеза. Изучены выживаемость клеток (анализ колониеобразования), их пролиферативная, метаболическая активность (МТТ-тест), а также клеточная гибель (метод проточной цитометрии с использованием ДНК-связывающего флуоресцентного красителя 7-аминоактиномицина D, 7-AAD) и транскрипционные профили ключевых генов, ассоциированных с регуляцией апоптоза - *PMAIP1* (Noxa) и *BIRC5* (Survivin). В конечном итоге предпринятый интегральный подход позволил выявить новые особенности в дифференциальном ответе клеток различных линий на повреждающее действие ионизирующего излучения различного качества, в том числе в его комбинации с доксорубицином. Другой отличительной особенностью этой работы является проведение биоинформационного анализа с целью поиска белок-белковых взаимодействий и анализа онтологии генов, что позволило выявить ключевые локусы, ассоциированные с апоптотической гибелью клеток при воздействии повреждающих факторов.

Достоверность полученных результатов основана на применении современных, соответствующих поставленным задачам методических подходов, критическом изучении мировой литературы, проведенном биоинформационном анализе с целью выявления генов - кандидатов, вовлеченных в регуляцию апоптоза и их регуляторных сетей, большом экспериментальном материале, адекватной статистической обработки данных. Материалы диссертации хорошо апробированы. Они были представлены на 13 отечественных и международных научно-практических конференциях, съездах. По теме диссертации опубликовано 30 печатных работ, в том числе 7 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для материалов кандидатских диссертаций, и 23 тезисов докладов.

Проведенное комплексное изучение ответа пяти клеточных линий (четыре линии представлены опухолевыми клетками) на повреждающее действие ионизирующего излучения разного качества с применением классических методов радиобиологии, а также проточной цитометрии и молекулярно-генетических подходов, обуславливает **научную и практическую значимость** выполненной работы. Полученные данные расширяют представления о молекулярных механизмах, ассоциированных с повышенной чувствительностью/устойчивостью опухолевых клеток к комбинированному действию ионизирующего излучения разного качества и химиотерапевтического препарата доксорубицина. Это необходимо учитывать в процессе дальнейшей разработки прогностических моделей ответа опухолей на лучевую терапию и поиске молекулярных мишеней для таргетного воздействия с целью повышения радиочувствительности злокачественного новообразования.

Диссертационная работа изложена по традиционному плану и включает подробное оглавление, введение, главы «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», а также «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Последний содержит 165

ссылок на работы российских и зарубежных авторов, 133 из которых изданы на английском языке. Диссертация изложена на 167 страницах машинописного текста, содержит 47 рисунков, 16 таблиц.

Во «Введении» достаточно чётко обоснована актуальность проводимого исследования, изложена степень разработанности темы, определены цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, дано краткое описание методологии и методов исследования. Заканчивается «Введение» изложением выносимых на защиту основных положений, раскрыты степень достоверности и апробация результатов, соответствие диссертации паспорту научной специальности, описывается личный вклад автора.

Далее следует глава «Обзор литературы», представленная на 32 страницах. В начале этой главы изложены физические характеристики взаимодействия различных типов ионизирующих излучений с веществом с обоснованием высокого потенциала лучевой терапии злокачественных опухолей тяжелыми заряженными частицами. Описаны молекулярные механизмы, ассоциированные с белком - опухолевым супрессором p53 и ответом опухолевых клеток на повреждающее действие радиации. Представлена информация о пяти клеточных линиях, часто используемых в радиобиологических исследованиях, в том числе и в работе диссертанта. Рассмотрены молекулярные механизмы противоопухолевого действия доксорубицина, обоснованы его выбор и длительность инкубации с ним клеток в выполненном Мельниковой А.А. исследовании. Детально изложены молекулярные механизмы регуляции внутреннего и внешнего путей апоптотической гибели клеток с акцентом на функциональную роль белков Noxa и Survivin. По сути, это является обоснованием предпринятого в данной работе исследования транскрипционной активности двух локусов.

В целом, обзор литературы выполнен на достаточно высоком научном уровне. Тем не менее, к этой части диссертации имеется

следующие замечание: хотелось бы видеть заключение автора по состоянию проблемы, непосредственно касающейся выполненной им работы. А именно, по имеющимся данным о молекулярно-клеточных путях индукции гибели опухолевых и нормальных клеток при воздействии доксорубина и комбинированном действии этого противоопухолевого антибиотика с ионизирующим излучением.

В следующей главе «Материалы и методы» подробно описаны условия культивирования клеток, протокол определения релевантной концентрации доксорубина для исследований, условия облучения и физические характеристики воздействующего излучения, последовательность этапов проведения экспериментов по экспонированию клеток. Представлены методики определения клоногенности, времени удвоения клеток, их метаболической активности, жизнеспособности клеток методом проточной цитометрии, а также подробно изложены этапы анализа экспрессии исследованных генов, ассоциированных с регуляцией апоптоза - *PMAIP1* (Noxa) и *BIRC5* (Survivin), включая алгоритм подбора праймеров с использованием BLAST. Продемонстрированы биоинформационные ресурсы для определения функциональных аннотаций и ассоциаций генов, прогнозирования их участия в регуляторных сетях, определения белок-белковых взаимодействий (UniProt, STRING, Cytoscape, KEGG, GO). Глава заканчивается кратким изложением примененных для анализа полученных данных статистических методов.

Таким образом, в данной главе предоставлена вся необходимая основная информация по использованным в экспериментальных исследованиях достаточно надежных методических подходов.

В главе 4 представлены результаты исследований и их обсуждение. Первые четыре ее раздела посвящены результатам анализа клоногенной способности, времени удвоения клеток, их метаболической активности при раздельном и комбинированном действии ионизирующих излучений

(γ -лучи, ионы ^{12}C , протоны) и доксорубицина. Представлены результаты расчета ОБЭ протонов и ионов ^{12}C , которые зависят от типа излучения и исследованной линии клеток. Проведенное ранжирование полученных данных показало дифференцированный клеточный ответ в зависимости от воздействующего фактора и анализируемого параметра. Так, наибольшей чувствительностью к доксоциклину характеризуются клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7. Клеточная линия иммортализованных фибробластов человека hTERT демонстрировала наивысшую чувствительность к действию ионов ^{12}C по всем трем изученным показателям. Клетки MCF-7 проявили выраженную резистентность к действию всех трех видов излучения по тесту клоногенной активности, но при этом наиболее выраженное подавление метаболических процессов при воздействии γ -излучения и ионов ^{12}C . Показана существенная радиорезистентность клеточной линии SK-N-BE(2) независимо от типа излучения. Таким образом, выбор линий MCF-7 и SK-N-BE(2) для дальнейших исследований логически обоснован автором.

В пятом разделе рассматриваются результаты оценки жизнеспособности резистентных к облучению клеточных линий MCF-7 (при максимальной чувствительности к доксорубицину среди исследованных линий клеток) и SK-N-BE(2) методом проточной цитометрии. Показано, что комбинированное действие доксорубицина и корпускулярного излучения, но не γ -излучения, на клетки MCF-7 характеризуется синергетическим эффектом. Аналогичный результат наблюдался при облучении клеток нейробластомы в комбинации с рассматриваемым химиопрепаратом, причем наиболее выраженным он был при воздействии излучения ионов ^{12}C .

Следующий раздел посвящен биоинформатическому анализу, основанному на экспериментально подтвержденных взаимодействиях белков и продемонстрировавшему взаимодополняющие и противоположные роли *PMAIP1* и *BIRC5* в регуляции клеточного цикла.

Продукт гена *PMAIP1* действует как индуктор р-53 зависимого митохондриально-опосредованного апоптоза, тогда как *BIRC5* регулирует митоз и подавляет апоптоз, поддерживая клеточный гомеостаз.

Последние два раздела главы посвящены анализу экспрессии двух вышеуказанных генов и ее сопряженности с выявленными радиобиологическими эффектами. Показаны разнонаправленные изменения экспрессии двух исследованных локусов в результате воздействия как доксорубицина, так и ионизирующих излучений на клетки линии MCF-7: уменьшение этого показателя для гена *BIRC5* и увеличение для локуса *PMAIP1*. При этом, воздействие γ -излучения и ионов ^{12}C на клетки нейробластомы не приводило к изменениям экспрессии *BIRC5* и *PMAIP1*, соответственно. Заслуживает внимания, что, как правило, при воздействии доксоциклина в комбинации с радиацией эффекты изменения транскрипционной активности рассматриваемых генов снижались или даже отсутствовали (по сравнению с эффектами доксоциклина). Исключение из этой закономерности составило действие доксорубицина в комбинации с γ -излучением: наблюдался синергетический эффект увеличения уровня экспрессии гена *PMAIP1* в двух клеточных линиях. Таким образом, выявлены как общие проявления, так и дифференциальные особенности транскрипционного ответа рассмотренных генов в опухолевых клетках разных линий. Достаточно профессионально выполнено обсуждение полученных А.А. Мельниковой результатов в свете данных мировой литературы.

По этой главе имеются следующие вопросы и замечания:

1. По сути, информация, содержащаяся в шестом разделе, является логическим продолжением обзора литературы и обоснованием предпринятого диссертантом изучения изменений экспрессии локусов *PMAIP1* и *BIRC5* в опухолевых клетках в результате воздействия на них рассматриваемых факторов. По моему мнению, данный раздел следовало

представить в виде отдельной главы, следующей за обзором литературы. К тому же, раздел «Результаты разработки праймеров для ПЦР-РВ» представляется лишним, его содержание перекрывается с таковым, представленным в главе «Материалы и методы».

2. Исходя из рис. 46 б (стр.131) воздействие γ -излучения не приводило к изменениям экспрессии гена *BIRC5*, результатом действия доксорубина являлось практически отсутствие экспрессии этого гена. Поэтому такое же крайне низкое значение транскрипционной активности этого гена после комбинированного действия химиопрепарата и γ -лучей – это эффект доксорубина, о синергизме здесь говорить не стоит (стр. 132).

3. Исходя из рис. 47 (стр. 132) апоптотический ген *PMAIP1* активно экспрессируется в опухолевых клетках нейробластомы (относительный уровень экспрессии равен 1). Кроме того, такая же экспрессия этого гена наблюдается и после воздействия γ -излучения. Это явно противоречит информации, содержащейся в тексте диссертации.

4. Обращают внимание очень высокие коэффициенты корреляции, представленные в разделе 9. Диссертанту следовало бы указать количество экспериментальных точек, по которым проводился корреляционный анализ.

5. Выявленные диссертантом положительные корреляции между транскрипционной активностью гена *BIRC5* и показателями клоногенной, пролиферативной и метаболической способности экспонированных клеток представляются ожидаемыми и вполне объяснимыми. Хотелось бы увидеть рассуждения автора по поводу причины ассоциативных связей такой же направленности в отношении проапоптотического гена *PMAIP1* для клеток нейробластомы.

Далее следует «Заключение», в котором диссертант кратко резюмирует итоги проведенных исследований.

Рассматривая работу в целом, можно заключить, что она выполнена на высоком методическом уровне с охватом большого экспериментального материала. Диссертация хорошо написана и наглядно оформлена рисунками и таблицами. Сделанные выводы полностью соответствуют цели и задачам исследования, отражают полученные результаты, однако, по моему мнению, требуют сокращения. Последние характеризуются научной новизной и должны оказать влияние на будущие фундаментальные и прикладные исследования в радиобиологии, молекулярной онкологии, медицинской радиологии. К приведенным выше замечаниям добавлю, что в работе имеются некоторые стилистические погрешности, неточности, повторы в изложении информации, не везде поставлены ссылки на литературные источники. Однако все это не влияет на мою высокую оценку огромной работы, проделанной А.А. Мельниковой.

Содержание автореферата полностью согласуется с текстом диссертации и отражает ее основные положения и выводы.

Таким образом, по актуальности, новизне, научной и практической значимости, объему представленного материала, достоверности и обоснованности полученных результатов диссертация «Оценка влияния ионизирующих излучений и антибиотика антрациклинового ряда доксорубицина в отношении клеточных линий опухолевого и нормального происхождения *in vitro*» представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, в которой решена важная задача по выявлению новых закономерностей ответа опухолевых клеток и его молекулярных механизмов на комбинированное воздействие доксорубицина и ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям пп. 9-11 и 13-14 «Положения о присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от

24.09.2013 г. (в редакции постановления Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 г. «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней» и постановлений Правительства РФ № 1024 от 28 августа 2017 г., № 1168 от 1 октября 2018 г. и № 426 от 20 марта 2021 г.) и предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Мельникова Анжелика Александровна, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.1. Радиобиология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории экологической генетики
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института общей генетики
им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук

Кузьмина Нина Станиславовна

Адрес организации: 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина 3.
Интернет сайт: <http://www.vigg.ru/>
e-mail: iogen@vigg.ru
тел.: 8 (499) 135-62-13

«5» мая 2026 г.

Подпись Н.С. Кузьминой заверяю

Заместитель директора по научной работе
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института общей генетики
им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук
кандидат химических наук



Пестов Николай Борисович