

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
**ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

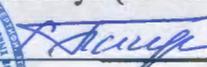
Россия 142432 г. Черноголовка Московская обл. Северный проезд, д.1. ИФАВ РАН
Тел: (496) 524-95-08 • Факс:(496) 524-95-08

05.06.2018₂ № 12321-9311/283-0

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института физиологически активных веществ
Российской академии наук (ИФАВ РАН)




С.О. Бачурин

» июня 2018 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Аминина Дмитрия Львовича
«Молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия кукумариозида А₂-2 и
созданного на его основе лекарственного средства кумазид»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.01.04 – «Биохимия»

Актуальность темы диссертации и научная новизна полученных результатов.

Поиск природных и синтетических соединений, влияющих на физиологию клеток, модифицирующих функциональные свойства биомембран и модулирующих ионные потоки и сигнальные пути, а также изучение молекулярных механизмов действия таких соединений представляется актуальной задачей при создании новых регуляторов клеточной активности. В итоге открытие таких соединений может привести к получению новых молекулярных инструментов для биохимии и биотехнологии, с одной стороны, и появлению новых биологически активных препаратов, - с другой.

Тритерпеновые гликозиды голотурий изучаются на протяжении длительного времени. Эти соединения обладают широким спектром биологической активности и проявляют выраженные мембранолитические свойства в микромолярном диапазоне концентраций. В то же время в низких нецитотоксических концентрациях некоторые из них активируют целый ряд внутриклеточных процессов и обладают выраженной иммуномодулирующей активностью. На основе тритерпеновых гликозидов голотурий был создан ряд иммуномодулирующих ветеринарных препаратов, официально применяемых в животноводстве. Однако, несмотря на большое количество работ, связанных с изучением физиологической активности тритерпеновых гликозидов голотурий, механизм их иммуномодулирующего действия на клеточном и субклеточном уровне изучен недостаточно. Имеющиеся сведения не дают четкого представления о молекулярных механизмах, лежащих в основе проявления стимулирующего эффекта этих соединений.

В связи с этим поставленная в диссертационной работе Аминина Дмитрия Львовича задача исследования молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия природного соединения - тритерпенового гликозида кукумариозида A₂-2, выделенного из промысловой дальневосточной голотурии *Cucumaria japonica* и являющегося основой разработанного в ТИБОХ ДВО РАН нового иммуномодулирующего препарата кумазид, представляется весьма своевременной и актуальной.

Достоверность и обоснованность полученных результатов и выводов.

Описанные в работе исследования проведены с использованием широкого набора современных методов биохимии и клеточной биологии. Эксперименты выполнены в достаточном количестве повторностей, для сбора и анализа данных применялось специализированное программное обеспечение. Используемые автором методы проведения исследований адекватны поставленным задачам, объем проведенных экспериментов позволил получить результаты с высокой степенью достоверности, на которой базируются все сделанные в диссертационной работе выводы.

Структура и объем работы.

Диссертационная работа Аминина Дмитрия Львовича состоит из нескольких разделов. Во «Введении» представлены актуальность, научная новизна и практическая значимость работы, а также сформулированы ее цели, задачи и основные положения. Первая глава «Литературный обзор» посвящена биологической активности тритерпеновых гликозидов. Во второй главе «Материалы и методы» описаны биологический материал, приборы, реактивы, а также основные методы исследования и эксперименты. В третьей главе «Результаты и обсуждение» проанализированы полученные автором экспериментальные данные. Раздел «Заключение» содержит констатирующую часть диссертации. В конце работы приведены «Выводы», «Список используемых сокращений»

и «Список литературы». Диссертация изложена на 310 страницах, содержит 90 рисунков, 50 таблиц, и 1 схему; список литературы включает 484 цитируемых работ.

Глава «Результаты и обсуждение», в которой непосредственно представлены результаты исследования, состоит из нескольких разделов. В первом разделе содержатся экспериментальные данные о цитотоксической активности ряда тритерпеновых гликозидов голотурий, включая кукумариозид А₂-2, на различных клеточных моделях, позволяющие определить диапазон концентраций и полумаксимальные эффективные концентрации, при которых гликозиды проявляют цитотоксическую активность.

Во втором, третьем и четвертом разделах описаны результаты определения иммуномодулирующей активности гликозидов голотурий, кукумариозида А₂-2 и препарата кумазид. На этом этапе работы было показано, что кукумариозид А₂-2 в наномолярных концентрациях вызывает активацию клеток иммунной системы и потенцирование ряда клеточных функций. Здесь демонстрируется существенное уменьшение цитотоксической активности кумазида в сравнении с исходным гликозидом и показана способность препарата усиливать лизосомальную активность макрофагов. Показано, что препарат практически безопасен при внутрижелудочном введении, не обладает кумулятивной, хронической и репродуктивной токсичностью и не проявляет мутагенные свойства.

Центральное место в диссертационной работе занимают исследование специфической иммунологической (раздел 3.5) и противоопухолевой активности препарата кумазид (раздел 3.6), изучение фармакокинетического (раздел 3.7) и фармакодинамического (раздел 3.8) поведения препарата. Специфическая активность кумазида выражается в усилении фагоцитоза и бактерицидной способности лейкоцитов и повышении устойчивости животных к бактериальным инфекциям. Препарат индуцирует продукцию ряда цитокинов, увеличивает количество антителообразующих клеток, оказывает радиозащитное действие, стимулирует процессы кроветворения и обладает противоопухолевой активностью. Фармакокинетика кумазида характеризуется быстрым всасыванием препарата при внесосудистых способах введения; скорость выведения препарата зависит от способа его введения и является минимальной при пероральном приеме.

Несомненным достоинством работы является установление молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия кукумариозида А₂-2. Методами протеомики были определены внутриклеточные белки-мишени, экспрессия которых регулируется в спленоцитах мыши при действии гликозидов. Они представлены белками, принимающими непосредственное участие в регуляции клеточной пролиферации, адгезии и подвижности,

а также формировании фаголизосом. Эти белки вовлечены в регулирование движения биомембран, ремоделирование цитоскелета и сигнальную трансдукцию.

Наиболее значимым результатом является установление того факта, что мембранными молекулярными мишенями иммуностимулирующего действия кукумариозида A_2-2 являются пуринергические рецепторы P2X семейства (преимущественно P2X4 типа), обеспечивающие Ca^{2+} -сигнализацию в мембране макрофагов. Основываясь на экспериментальных данных и результатах компьютерного моделирования, установлено, что кукумариозид A_2-2 взаимодействует с внеклеточным доменом пуринергических рецепторов и действует по типу аллостерического модулятора. Связываясь с рецепторами, гликозид усиливает ответ клеток на АТФ и частично снимает эффект их десенситизации. Клетки с повышенной плотностью пуриновых P2X1 и P2X4 рецепторов являются клетками-мишенями и принимают участие в Ca^{2+} ответе на аппликацию гликозида.

Работа выполнена на высоком методическом уровне. Для установления молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия кукумариозида A_2-2 был использован широкий арсенал как традиционных, так и новейших биохимических и физико-химических методов исследования, включая спектрофлуориметрию и анализ флуоресцентного изображения клеток (имаджинг), радиолигандный, электрофизиологический (пэтч-кламп), иммуноцитохимический методы, ПЦР в реальном времени и магнитно-резонансную томографию. Доказательная база установления молекулярных мишеней действия кукумариозида A_2-2 строилась на результатах использования сконструированной двугибридной тест-системы с репортерным геном, применения методов протеомики, поверхностного плазмонного резонанса, ингибиторного анализа, нокдауна гена с помощью малых интерферирующих РНК, иммуноботинга, компьютерного моделирования и ряда других. Работа с первичными клеточными культурами сопровождалась применением лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Для изучения фармакокинетики применялись радиоспектроскопия и масс-спектрометрические методы MALDI-TOF-MS и MALDI-IMS.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертационной работы, которая по своей структуре и техническому оформлению соответствует требованиям ВАК.

По содержанию диссертационной работы можно сделать следующие несущественные замечания, которые скорее имеют форму вопросов к автору.

1. В виде какой лекарственной формы автор видит перспективы применения нового лекарственного препарата кумазид?

2. При определении острой токсичности была установлена большая разница в токсичности препарата при внутрижелудочном и внутривентральном применении. С чем, с точки зрения автора, это связано?
3. Часть экспериментов (влияние на устойчивость к инфекции мышей, радиозащитное действие, влияние на развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа и количество АОК в селезенке) была выполнена при подкожном введении соединений. Чем обусловлен данный способ введения?

Заключение.

Полученные автором результаты вносят существенный вклад в понимание молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия тритерпенового гликозида кукумариозида А₂-2 и кумазида и углубляют существующие представления о влиянии низкомолекулярных биорегуляторов на клетки иммунной системы. Фундаментальные знания, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, характеризуют механизм действия иммуномодулирующего лекарственного средства кумазид и создают методологическую основу для изучения механизма действия новых лекарственных средств, созданных на основе тритерпеновых гликозидов голотурий.

Представленная диссертационная работа Аминина Д.Л. «Молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия кукумариозида А₂-2 и созданного на его основе лекарственного средства кумазид» по теоретическому уровню, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости соответствует требованиям, изложенным в п.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Настоящий отзыв обсужден и принят на научном семинаре сотрудников Отдела медицинской и биологической химии ИФАВ РАН. Присутствовало на заседании 15 чел. Результаты голосования: «за» – 15 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол № 3 от 31 мая 2018 г.

Составители отзыва:

Клочков Сергей Георгиевич, кандидат биологических наук, заместитель директора ИФАВ РАН по научной работе, специальность 02.00.10 – биоорганическая химия, 142432, г. Черноголовка Московской обл., Северный проезд, д. 1, тел. +7(49652)42-525, e-mail: klochkov@ipac.ac.ru;

