

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

АМИНИНА ДМИТРИЯ ЛЬВОВИЧА

«Молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия кукумариозида

A₂-2 и созданного на его основе лекарственного средства кумазид»,

представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Рецензируемая работа посвящена одной из актуальных проблем современной биохимии – анализу молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия некоторых биологически активных веществ (БАВ), продуцируемых морскими гидробионтами. Актуальность работы определяется необходимостью поиска новых высокоэффективных иммуностимулирующих лекарственных средств на фоне снижения иммунитета населения и для восстановления иммунных реакций при вторичных иммунодефицитных состояниях человека, появляющихся вследствие различных причин.

Данное исследование, являясь продолжением многолетних экспериментов, проводимых в лаборатории химии морских природных соединений и лаборатории биоиспытаний и механизмов действия биологически активных веществ Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН с новыми тритерпеновыми гликозидами, выделенными из дальневосточных гидробионтов, важно для понимания механизмов физиологической активности этих веществ. Полученные автором данные имеют, прежде всего, фундаментальное значение, но необходимо отметить несомненную практическую значимость представленных результатов для клинической практики и ветеринарии.

Конкретные задачи работы связаны с изучением молекулярного механизма иммуномодулирующего действия тритерпеновых гликозидов голотурий на клеточном и субклеточном уровне. В центре внимания автора -

взаимодействие тестируемых веществ с клеточными мембранами иммунокомпетентных клеток.

На основе многочисленных, трудоемких и чрезвычайно разнообразных экспериментов автором получены аргументированные доказательства цитотоксических и иммуномодулирующих свойств ряда тритерпеновых гликозидов голотурий, принадлежащих отрядам *Aspidochirota* и *Dendrochirota*, а также препарата кумазид, что важно для оценки безопасности тестируемых веществ на различные системы клеточного и гуморального иммунитета. Впервые обнаружено, что максимальный иммуностимулирующий эффект кукумариозида A_2-2 проявляется в наномолярном диапазоне концентраций, что примерно в 100 раз ниже диапазона концентраций его мембранолитического и цитотоксического действия. Установлено преимущество препарата кумазид перед ранее созданными ветеринарными препаратами: снижение гемолитических, цитотоксических свойств при полном сохранении иммуномодулирующей активности. Обнаружено, что кумазид относится к группе иммуотропных препаратов, обладающих способностью стимулировать, главным образом, клеточное звено иммунитета.

Выявлен наиболее безопасный способ введения кумазида и обнаружен синергизм его противоопухолевого действия с другими противоопухолевыми препаратами. Достоверно показано, что тритерпеновые гликозиды голотурий не взаимодействуют с эстрагенными рецепторами и не обладают эстрогенной гормоноподобной активностью. В исследовании влияния ряда тритерпеновых гликозидов из голотурии *Cucumaria japonica* на кальциевый гомеостаз перитонеальных макрофагов мыши установлено, что под действием тестируемого гликозида кукумариозида A_2-2 происходит увеличение концентрации внутриклеточного кальция $[Ca^{2+}]_i$ в цитоплазме клеток, причем ионы кальция поступают в цитоплазму клетки из внеклеточной среды, минуя потенциал-чувствительные Ca^{2+} каналы, Na^+/Ca^{2+} -обменник и рецептор-управляемые Ca^{2+} каналы, сопряженные с G-белком. Полученные результаты

углубляют наши представления о влиянии низкомолекулярных биорегуляторов на клетки иммунной системы.

Установлены внутриклеточные молекулярные мишени действия исследованных гликозидов. Это - внеклеточный домен пуриновых рецепторов P2X семейства (преимущественно P2X4 типа), обеспечивающих Ca^{2+} проводимость в мембране макрофагов под действием внеклеточного АТФ и поступление ионов кальция из окружающей внеклеточной среды в цитоплазму клеток. Нокдаун экспрессии гена P2X4 рецептора в макрофагах приводил к существенному ингибированию кальциевой сигнализации в клетках при аппликации гликозида. Расчетные данные, полученные при моделировании комплекса гликозида с пуриновым рецептором P2X4 типа, показали, что во взаимодействие с гликозидом вступают две (или более) субъединицы рецептора. При этом установлено, что связывание гликозида с данным рецептором не затрагивает сайт связывания рецептора с АТФ, то есть конкуренция двух лигандов за сайт связывания на рецепторе отсутствует. Взаимодействие тестируемых гликозидов с данными рецепторами происходит по типу аллостерической модуляции. Гликозид, связываясь с рецепторами, усиливает ответ клеток на АТФ и частично снимает эффект инактивации рецепторов, вызывая запуск каскада внутриклеточных реакций, приводящих к иммуностимулирующему ответу клеток.

Методами протеомики впервые установлен ряд белков, экспрессия которых регулируется под действием тритерпеновых гликозидов голотурий. Эти белки принимают непосредственное участие в регуляции пролиферации, адгезии и подвижности клеток, а также вовлечены в сигнальную трансдукцию.

Масштаб проделанной работы и уровень публикаций, в которых представлены результаты, свидетельствуют об очень высоком методическом уровне, умении корректно и квалифицированно использовать новые методы, большой эрудиции и работоспособности автора.

Методы, использованные в работе, адекватны поставленным задачам и представляют чрезвычайно большой и разнообразный набор: это электрофизиологические эксперименты, проточная цитометрия, иммунохимия с последующей конфокальной микроскопией, иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг, методы протеомики, радиоизотопные методы, методы масс-спектрометрии, разнообразные техники молекулярных флуоресцентных зондов, микроцитофлуориметрия, анализ флуоресцентного изображения клеток, молекулярно-генетические методы, биоинформационный анализ, метод молекулярной динамики лиганд-рецепторного взаимодействия, фармакокинетические и противоопухолевые исследования, работа с линиями опухолевых клеток, с линиями подопытных крыс и мышей. Комплексное использование этих методов составляет сильную сторону работы. Все методы использованы вполне корректно и квалифицированно, что обеспечивает достоверность полученных результатов. Весь материал изложен логично, в строгой и ясной форме.

В целом работа Д.Л. Аминина не встречает каких-либо возражений, есть только мелкие грамматические неточности, неудачные фразы и небольшие упущения. В Литобзоре смешиваются понятия родов и видов (стр. 22), но вся биохимическая информация представлена корректно. В разделе совместно проводимых исследований надо указывать коллег единообразно (звание, а потом должность, или наоборот). В разделе «Материалы и методы» отсутствует информация о фирме и стране-производителе DAPI, этидиум бромида и ДМСО, тогда как для других реагентов эта информация приведена.

Сочетание слов «раствор внеклеточного матрикса» не стоит использовать, надо указать, раствор какого белка внеклеточного матрикса был использован. При упоминании полилизина, следует указать молекулярную массу использованного белка – от этого зависят результаты. При описании распластывания перитонеальных макрофагов мыши в присутствии тритерпеновых гликозидов, говорится, что анализ проводили «в течение 2 час

после адгезии». Кроме того, в диссертационной работе использовано выражение «Адгезия макрофагов на внеклеточный матрикс». Для обеспечения клеточной подвижности требуется целый комплекс взаимодействий между «молекулами адгезии и их лигандами на других клетках или внеклеточном матриксе». Мне непонятно, что имел в виду автор.

Во всех подписях к рисункам, где есть упоминание о проточной цитометрии, стоит указывать марку проточного цитометра (которая, конечно же, дана в разделе «Материалы и методы»), также как указана марка используемых микроскопов, либо это не делать вообще в подписях к рисункам. На всех рисунках, где представлены изображения клеток, надо было дать масштабную линейку, и в некоторых случаях, цветовые ключи. При упоминании некоторых рисунков (рис. 57) допущены ошибки в указании предыдущих и настоящих рисунков.

Часто в разделе «Результаты» представлена информация, которая должна быть в разделе «Методы». В автореферате в таблице 1 и в диссертации в аналогичной таблице 4, где представлены данные о влиянии кукумариозида А2-2 на жизнеспособность клеток различного происхождения, а также в ряде некоторых рисунков и таблиц, отсутствуют доверительные интервалы. Это затрудняет восприятие материала.

Какая-то путаница с указанием рисунков – в тексте не нашла ссылку на рис. 39. Есть ссылка на рис. 38 и 40. На рисунке, на котором представлены результаты проточной цитометрии, в подписях к рисунку указано, что это фракция фагоцитов, но при этом на рисунке Б и В указаны цветом живые и мертвые бактерии, а где фагоциты? Очень сложно разобраться, что же на самом деле хотел указать автор.

Я согласна с предположением автора, что повышенную экспрессию в спленоцитах мыши белка 1312 (пятно на рис. 59 и 60) вследствие действия тритерпеновых гликозидов можно рассматривать как показатель интенсификации энергоснабжения клеток, но предположение об усилении

клеточных функций, таких как пролиферация и иммуностимуляция, считаю малодоказательным, по крайней мере, относительно пролиферации.

При прочтении диссертации я не нашла ответа, почему из 6 существующих отрядов голотурий, охарактеризованы в данной работе БАВ только из двух отрядов этих животных.

Безусловно, при оформлении любой работы ошибки есть, и их можно не заметить, поэтому в целом, все эти замечания ни в коей мере не умаляют безусловных достоинств исследования. Обсуждение результатов проведено квалифицировано и отвечает поставленным задачам. Обращает на себя внимание очень грамотное проведение статистического анализа огромного массива данных, полученных в течение нескольких лет. Это позволило расширить наши знания об молекулярных механизмах действия БАВ морских организмов.

Диссертация изложена на 310 страницах машинописного текста. Иллюстративный материал представлен в 50 таблицах, 90 рисунках и содержит 1 схему. Все рисунки являются очень информативными, а многие из них просто настоящее украшение диссертации и автореферата. Литературный обзор соответствует задачам исследования, широко охватывая рассматриваемую проблему (484 цитируемых работы) и включает новейшую литературу по теме диссертации. Обзор литературы (как и все последующие разделы диссертационной работы) очень хорошо написан, легко и с интересом читается. Только непонятно, почему вынесена в отдельную главу, не связанную с разделом 1.9. «Взаимодействие с рецепторами», глава 1.14. P2X рецепторы.

По материалам диссертации опубликовано 31 научная статья в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 7 глав в книгах и 5 патентов. Результаты неоднократно были представлены на международных и российских конференциях. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Д.Л. Аминина на тему «Молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия кукумариозида А₂-2 и созданного на его основе лекарственного средства кумазид» является законченной научно-исследовательской работой, содержит новое решение важных и актуальных проблем современной биохимии и имеет важное научно-практическое значение. По актуальности темы, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности и новизне результатов, их значимости для науки и практики, диссертационная работа Д.Л. Аминина отвечает требованиям, предъявляемых к докторским диссертациям, а автор работы заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

21.05.2018

Главный научный сотрудник Лаборатории клеточных технологий
Федерального Государственного Бюджетного учреждения науки
Национального научного центра морской биологии

Дальневосточного научного центра Российской академии наук,

Доктор биологических наук, профессор
690041, Владивосток, Пальчевского 17.

Н. А. Одинцова

(423) 2311161,

nelodin@mail.ru

Подпись Н.А. Одинцовой заверяю:

Ученый секретарь ННЦМБ ДВО РАН, к.б.н.

В.Е. Жуков

