

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Аминина Д.Л. на тему «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 исследования.

Диссертация Дмитрия Львовича Аминина посвящена расшифровке механизма действия тритерпеновых гликозидов иглокожих, в частности голотурий, на иммунокомпетентные клетки. Актуальность исследования обусловлена необходимостью разработки новых подходов к регуляции функций иммунной системы. Хорошо известно, что иммунные реакции протекают при согласованном взаимодействии нескольких типов клеток, таких как нейтрофилы, моноциты, макрофаги, лимфоциты и другие. Изменение функциональной активности одного типа клеток с помощью какого либо воздействия, как правило, приводит к компенсаторным реакциям со стороны других участников иммунного каскада. В результате итоговый иммуномодулирующий эффект маскируется или становится неуправляемым. Поэтому, необходимым представляется разработка подхода, при котором активное вещество способно взаимодействовать с разными типами иммунных клеток. Тритерпеновые гликозиды обладают выраженным мембранотропным действием, механизм которого основан на способности гликозидов изменять ионную проницаемость мембран клеток за счет взаимодействия со стериными мембранами. Общий характер действия на мембранные структуры разных типов клеток делает перспективным применение тритерпеновых гликозидов голотурий в качестве иммуномодуляторов. Однако систематические исследования специфической иммунотропной активности этих соединений не проводились, а механизм их взаимодействия с клеточными мембранами иммуноцитов остается не известным.

Общая методология и внутреннее единство работы.

В диссертации Д.Л.Аминина использован систематический подход к изучению физиологической активности природных соединений. Объединяющим стержнем работы являются тритерпеновые гликозиды голотурий с установленным строением и известными химическими свойствами. Определение физиологической активности одних и тех же соединений проведено на разных уровнях исследования — молекулярном, клеточном и организменном. При этом, зарегистрированы эффекты гликозидов при нескольких способах введения — пероральном, внутрибрюшинном, подкожном. Такой подход позволяет автору наиболее полно представить картину взаимодействия тритерпеновых

гликозидов с биологическими системами. Поскольку основное внимание уделяется активности иммунной системы, вполне логичным является выбор макрофагов/моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов в качестве клеточных мишеней действия гликозидов. Важно, что автор не ограничивается только одним типом иммунокомпетентных клеток. Используемые методы и подходы дополняют друг друга, а повышение устойчивости к экспериментальным опухолям и инфекциям указывает на интегральное действие исследованных веществ на активность иммунной системы. В целом вся логика построения работы представляется вполне убедительной и свидетельствует о внутреннем единстве работы. Всю цепочку событий, вызванных кукумариозидами в иммунной системе, автор представляет в обобщающей схеме, приведенной в заключении.

Основные научные положения и степень их обоснованности.

Наиболее значимым выводом диссертации следует считать заключение о том, что кукумариозид связывается с пуриновыми рецепторами зрелых макрофагов и это связывание приводит к активации клетки. Обоснованность данного заключения не вызывает сомнений. Действительно, показано, что стимулирующий эффект кукумариозида отменяется при использовании селективных блокаторов или специфических к пуринорецепторам антител, а также при нокдауне генов данных рецепторов с помощью малых интерферирующих РНК. Более того, о влиянии кукумариозида на пуриновые рецепторы свидетельствует увеличение экспрессии белка P2X₄, выявленное с помощью иммуноблоттинга, а также результаты анализа взаимодействия гликозида с рекомбинантным белком P2X₄, проведенного с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса. Автор также демонстрирует, что динамика ответа макрофагов на аппликацию кукумариозида совпадает с таковой на добавление в среду АТФ — основного лиганда пуринорецепторов, а удаление из среды АТФ приводит к отмене эффекта гликозида. Заключение о том, что именно зрелые макрофаги являются основной клеточной мишенью действия кукумариозида сделано на основании двойного иммуноцитохимического окрашивания клеток с применением специфических антител и клеточного анализа методами конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии.

У автора есть все основания полагать, что взаимодействие с пуринорецепторами и перенос ионов кальция внутрь макрофагов лежит в основе иммуностимулирующего действия гликозидов. Во-первых, кукумариозид и другие тритерпеновые гликозиды стимулируют распластывание макрофагов, увеличивают активность в них лизосом, усиливают образование активных форм кислорода. Во-вторых, показано, что кукумариозид увеличивает поглотительную активность нейтрофилов периферической крови человека, стимулирует продукцию фактора некроза опухолей и интерлейкина-6 моноцитами, а

также восстанавливает мембранную экспрессию CD3 и CD4 молекул иммуносупрессированными лимфоцитами крови человека. Кроме того, исследованные соединения оказывали противоопухолевое и антиинфекционное действие *in vivo*, что также указывает на активацию иммунной системы.

В качестве замечания к данному разделу работы следует отметить недостаточное внимание автора к интерпретации данных о снижении иммунной активности под действием тритерпеновых гликозидов. Например, было выявлено, что кукумариозид A₇₋₁ снижает активность макрофагов (с.141, рис.25Б), а кумазид подавляет фагоцитарную активность нейтрофилов (с.164, табл.17, рис.37). Также хотелось бы услышать мнение автора о том, почему кумазид, оказывая разностороннее иммуностимулирующее действие, не влияет на реакцию ГЗТ у мышей?

Очень важным результатом работы представляется установление белков, экспрессия которых изменяется при действии гликозидов на лимфоциты. При этом выявлены как белки, экспрессия которых одинаково регулируется разными гликозидами, так и белки, экспрессия которых характерна для действия кукумариозида A₂₋₂ по сравнению с действием фрондозидов А. Применение самых современных методов протеомного анализа с последующей верификацией полученных результатов с помощью ИФА делают данное заключение весьма убедительным.

Ряд положений, выносимых на защиту связан с характеристикой физиологической активности кумазида, заявляемого как новое лекарственное средство, полученное на основе тритерпеновых гликозидов из голотурии. Полученные результаты свидетельствуют о безопасности применения данного препарата. Фармакокинетическое исследование проведено с использованием кумазида, меченного тритием, что является классическим подходом. Анализ радиоактивных продуктов в органах и тканях лабораторных мышей показал, что концентрация кумазида в селезенке достигает максимальных значений за полчаса, а время полувыведения составляет несколько часов. Принципиально важным результатом является то, что кукумариозид A₂₋₂ в течение длительного времени не метаболизируется в ткани селезенки, что было установлено помощью такого высокочувствительного и надежного метода как MALDI-TOF масс-спектрометрия.

По данному разделу хотелось бы задать автору следующие вопросы. Можно ли на основании полученных данных считать, что исследованные гликозиды выводятся через почки? Почему, по мнению автора, кукумариозид практически не проникает в ткани селезенки и как можно объяснить активацию антителообразующих клеток в селезенке, если кукумариозид концентрируется преимущественно в области соединительнотканной капсулы?

Данные диссертационного исследования широко апробированы в докладах на конференциях различного уровня. Представленный список работ, опубликованных в отечественной и международной печати, позволяет судить о том, что исследования Д.Л.Аминина известны широкой научной общественности. Все аспекты проведенного исследования нашли отражение в рецензируемых журналах, которые имеют высокий индекс цитирования и входят в перечень, утвержденный Высшей аттестационной комиссией для докторских диссертаций.

Научная новизна полученных результатов

Научная новизна исследования заключается в расшифровке молекулярного механизма активации макрофагов кукумариозидом. Впервые выявлено связывание кукумариозида с пуриновыми рецепторами P2X семейства и показано, что это связывание приводит к накоплению ионов кальция в цитоплазме макрофагов. Установлено, что кукумариозид действует в качестве аллостерического модулятора пуриновых рецепторов. Связываясь с ними, гликозид усиливает ответ клеток на АТФ и частично снимает эффект десенсибилизации рецепторов. Впервые выявлены белки, экспрессия которых изменяется при действии гликозидов голотурий на лимфоциты. Наиболее значимыми признаны белки, участвующие в регуляции клеточной пролиферации, адгезии и подвижности. Ряд белков вовлечены в созревание фагосом, ремоделирование цитоскелета и сигнальную трансдукцию. Установлены основные фармакокинетические параметры, характеризующие поведение кумазида в организме при пероральном и внутривенном введении. Показано, что максимальные концентрации препарата обнаруживаются в крови, сердце, желудке, печени, почках и селезенке в примерно равной степени. Выявлено, что структурной трансформации кукумариозида в ткани селезенки практически не происходит, а его накопление наблюдается, главным образом, в области капсулы селезенки.

Значение полученных результатов для теории и практики

Полученные научные результаты вносят вклад в понимание связи между структурой и иммуностимулирующей активностью тритерпеновых гликозидов. Предложена концепция молекулярного механизма действия тритерпеновых гликозидов на иммунокомпетентные клетки, в частности макрофаги. Получен массив данных, необходимых для создания нового лекарственного препарата, кумазида, обладающего иммуностимулирующей активностью. Дано научное обоснование применения кумазида в качестве иммунокорректирующего средства при нарушениях функций иммунной системы, в частности при опухолевых и инфекционных заболеваниях, радиоактивном поражении. Разработаны экспериментальные подходы к применению МАЛДИ масс-спектропии

для определения тритерпеновых гликозидов в биологических тканях. Используемые методы радиоактивного мечения гликозидов голотурий могут быть применены в фармакодинамическом и фармакокинетическом анализе гликозидов другого происхождения. Практическое применение в дальнейших научных исследованиях могут найти разработанные тест-системы, экспрессирующие эстрогенные или пуринаргические рецепторы, на основе дрожжевых и бактериальных клеток.

Структура и оформление диссертации.

Диссертация Д.Л. Аминина представлена в виде рукописи, оформленной в традиционной манере для работ, посвященных изучению биохимических механизмов действия природных соединений. Диссертация включает в себя 3 главы и логично завершена текстами заключения, выводами и списком литературы.

В главе Обзор литературы кратко, но достаточно информативно описываются причины исследовательского интереса к тритерпеновым гликозидам, а также формулируются проблемы применения этих соединений для регуляции физиологических процессов. Мне понравилось, что автор включил в аналитический обзор данные о гликозидах не только животного, но и растительного происхождения. Очень важным и уместным является раздел, посвященный пуринаргическим рецепторам, благодаря которому легче воспринимаются результаты проведенного исследования.

Подробное описание всех проведенных экспериментов дано в главе Материалы и методы, хотя некоторые детали были упущены автором. Например, *не указано какой липополисахарид использовался для стимуляции клеток? Не указано как взвешивались лапки мышей при регистрации РГЗТ. Если лапки отрезались, то по какой границе? В опытах с лейкоцитами крови человека не понятно использовался ли один и тот же образец крови для получения трех клеточных фракций (нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов), активность которых затем одновременно измерялась?*

В главе Результаты исследования разделы, содержащие данные, необходимые для практического внедрения препарата кумазид, возможно, логичнее смотрелись бы в завершающей части данной главы, то есть после изложения всех данных о молекулярном механизме действия кукумариозида.

Изложенный материал хорошо проиллюстрирован, однако некоторые рисунки хотелось бы видеть более крупными. Особенно это касается уникальных данных, полученных с помощью методов МРТ (с.189) и МАЛДИ визуализации (с.201). На страницах 188-190 подзаголовки, заявляющие о влиянии кумазида на продолжительность жизни, не соответствуют последующему тексту, который, на самом деле, описывает влияние кумазида на рост опухолей.

Несомненным плюсом оформления диссертации является очень небольшое количество в тексте грамматических ошибок, неудачных выражений и лабораторных жаргонизмов. В целом оформление диссертации соответствует требованиям, предъявляемым ВАК. Автореферат полностью отражает содержание работы и содержит основные идеи и выводы диссертации.

Завершая рассмотрение докторской диссертации Аминина Дмитрия Львовича «Молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия кукумариозида А₂-2 и созданного на его основе лекарственного средства кумазид», важно подчеркнуть, что представленная диссертационная работа является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в биохимии: выяснен молекулярно-клеточный механизм действия на иммунокомпетентные клетки тритерпеновых гликозидов голотурий и выявлены закономерности их биологической активности, необходимые для применения данных веществ в медицине. Диссертация удовлетворяет всем требованиям ВАК РФ, предъявляемым к докторским диссертациям, и пункту 8 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор – Дмитрий Львович Аминин – безусловно, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

28 мая 2018 г.

Попов Сергей Владимирович _____
Доктор биологических наук, доцент
167982, г. Сыктывкар, ул. Первомайская, 50; Тел/факс: 8 (8212) 24-10-01
popov@physiol.komisc.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии Коми научного центра
Уральского отделения Российской академии наук
Заведующий отделом молекулярной иммунологии и биотехнологии
Специальность - 03.01.04 – биохимия

Подпись д.б.н. Попова С.В. заверяю

Ученый секретарь Института физиологии Коми НЦ УрО РАН

К.х.н. Пшунетлева Е.А. _____

