

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Багаманшиной Анастасии Викторовны**
«Цитотоксическая и противоопухолевая активность рекомбинантных аналогов лактаптина»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Актуальность темы выполненной работы

Работа Багаманшиной А.В. посвящена детальному исследованию механизма клеточной гибели под действием аналогов лактаптина RL2, продуцируемого в бактериальных клетках, изучению его специфической противоопухолевой активности и исследованию новых аналогов лактаптина, продуцируемых в клетках эукариот.

В настоящее время онкологические заболевания являются одной из наиболее серьезных проблем здравоохранения, которая требует разработки новых препаратов и методов лечения. Среди противоопухолевых препаратов нового поколения многообещающими являются средства на основе рекомбинантных белков и пептидов, в том числе, способных селективно индуцировать гибель раковых клеток с минимальными токсическими эффектами по отношению к здоровым клеткам организма. Один из таких белков, лактаптин, выделенный из молока человека и представляющий собой протеолитический фрагмент к-казеина, был охарактеризован как перспективный противоопухолевый препарат, поскольку вызывал гибель раковых клеток по механизму апоптоза. Широкую перспективу для перехода от аналитических к препаративным количествам противоопухолевых препаратов, необходимых для доклинических исследований, приобретает создание их рекомбинантных аналогов и исследование противоопухолевого механизма их действия, чему и посвящена диссертационная работа Багаманшиной А.В. Таким образом, актуальность работы Багаманшиной А.В. не вызывает сомнений.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа Багаманшиной А.В. построена по традиционной схеме и состоит из введения, трех глав, содержащих обзор литературы, экспериментальную часть, результаты собственных исследований с их обсуждением, выводов и списка литературы. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, содержит 42 рисунка, 10 таблиц и список цитируемой литературы из 235 источников.

Во введении автор формулирует цели и задачи своей работы, обосновывает актуальность исследования, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы посвящен разработке подходов терапии онкологических заболеваний с помощью белковых препаратов, запускающих аутофагию. Автором рассмотрены преимущества и ограничения применения различных белков для борьбы с онкологическими заболеваниями: широкого спектра цитокинов, α -лактальбумина молока человека, апоптина, конъюгированных и неконъюгированных моноклональных антител. Подробно описаны типы клеточной гибели с фокусировкой на таком механизме клеточной гибели как аутофагия и ее двояком влиянии на опухолевую прогрессию. Обзор отражает современные представления о предмете исследования и свидетельствует о высокой квалификации автора в области фундаментальной онкобиологии.

В Главе 2, содержащей экспериментальную часть, подробно описаны научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования. В исследовании используется широкий спектр современных иммунологических и молекулярно-биологических методов, включая такие как ОТ-ПЦР в режиме реального времени, вестерн-блот анализ, иммуоферментный и иммуноцитохимический анализ, метод проточной цитометрии и трансмиссионной электронной микроскопии. Автор хорошо владеет методами экспериментальной онкологии. Все методики, использованные и оптимизированные в исследовании, детально прописаны и пояснены, что предоставляет возможность для воспроизведения экспериментов по приведенным протоколам.

Глава 3 посвящена изложению и обсуждению результатов комплексного изучения цитотоксической и противоопухолевой активности рекомбинантного аналога лактаптина RL2, продуцируемого в бактериальных клетках, с использованием экспериментальных опухолей различной локализации. В диссертационной работе Багаманшиной А.В. детально исследован механизм клеточной гибели под действием RL2, который заключается в параллельном запуске апоптоза и аутофагии. На основе баланса между гибелью клетки по пути апоптоза и выживания за счет задействования механизма аутофагии под влиянием RL2 предложена модель, учитывающая вклад указанных процессов в индукцию гибели клетки. Показано, что эффективность запуска клеточной гибели под действием RL2 увеличивается в присутствии модуляторов аутофагии. Показано, что комбинированная терапия RL2 и ингибитором аутофагии хлорокином

увеличивает продолжительность жизни мышей-опухоленосителей по сравнению с монорежимными схемами лечения.

Сконструирован аналог лактапина EL1, представляющий собой аналог лактапина, продуцируемый в секретируемой форме эукариотическими клетками. Показано, что аналог EL1 обладает цитотоксической активностью, значительно превышающей активность RL2, которая сопоставима с активностью природного лактапина из молока человека.

Достоверность полученных результатов подтверждается статистической обработкой данных с использованием корректно подобранных критериев и тестов. Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Автор выносит на защиту пять научных положений, логично вытекающих из анализа результатов исследования и в достаточной степени аргументированные полученными результатами. Обоснованность научных положений и выводов, таким образом, не вызывает сомнений. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

Научная новизна работы заключается в доказательстве механизма гибели опухолевых клеток под действием аналога лактапина RL2 за счет запуска как процесса апоптоза, так и аутофагии. Впервые предложен молекулярный механизм переключения процессов RL2-индуцируемого апоптоза и аутофагии, ведущих к гибели клетки. Продемонстрирован противоопухолевый потенциал RL2 *in vivo* на модели гепатомы мыши ГА1 при различной локализации опухоли и солидной формы аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231.

Научно-практическая значимость работы заключается в разработке аналога лактапина EL1, продуцируемого в эукариотических клетках, который обладает более выраженным цитотоксическим эффектом по сравнению с RL2 в отношении опухолевых клеток различного гистологического происхождения.

Достоверность и обоснованность результатов исследований

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием широкого спектра современных иммунологических и молекулярно-биологических методов исследований, а также методов экспериментальной онкологии, детальным анализом полученных данных и корректными способами статистической обработки.

Результаты диссертационной работы опубликованы в четырех рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, доложены на восьми всероссийских и международных научных форумах и конференциях и представлены в виде одного патента РФ.

Следует отметить некоторые недостатки и замечания, которые возникают при тщательном изучении работы. В Разделе «Экспериментальная часть» упомянута директива (ECC Directive 86/609/ECC) по работе с лабораторными животными. Тем не менее, уже существует обновленная директива (ECC Directive 2010/63/EU). В Разделе «Результаты и обсуждение» Рис. 12 – 14, в подписях к рисункам указана везде концентрация RL2 0.15 – 0.2 мг/мл. Исходя из каких соображений была выбрана такая концентрация?

Диссертация написана на хорошем правильном русском языке, иногда встречаются опечатки и неудачные выражения.

Сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не снижают научной ценности полученных результатов и сделанных выводов и ни в коей мере не умаляют хорошего впечатления от работы.

Заключение

В целом, работа Багаманшиной А.В. является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой решена задача установления механизма запуска клеточной гибели под действием рекомбинантного аналога лактапина, имеющая существенное значение для применения аналогов лактапина в качестве препаратов противоопухолевой терапии

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации, оформлен в соответствии с требованиями, установленными «Положением о присуждении ученых степеней».

Таким образом, по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Багаманшиной А.В. отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к кандидатским диссертациям. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.03 «молекулярная биология» (биологические науки), а также критериям, определенным в пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложению №5, 6 Положения о диссертационных советах

Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации Багаманшина А.В, без сомнения, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «молекулярная биология» (биологические науки»

29 января 2020 г.

Ведущий научный сотрудник
Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот
Института химической биологии
И фундаментальной медицины СО РАН

Доктор биологических наук

Миронова Надежда Львовна

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д. 8
Рабочий телефон: 8(383)363-51-61
e-mail: mironova@niboch.nsc.ru

Подпись Мироновой Надежда Львовны заверяю

Зам. директор по научной работе
ИХБФМ СО РАН,
к.х.н., доцент

Коваль Владимир Васильевич

