

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**члена-корреспондента РАН, доктора биологических наук, профессора,
заведующего Лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и
вирусологии**

**Федерального государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования «Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет»**

Нетёсова Сергея Викторовича

**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 исследования

В связи с большими успехами в борьбе с инфекционными и сердечно-сосудистыми заболеваниями их роль среди причин смертности людей в последние десятилетия неуклонно снижается. К сожалению, прогресс в лечении онкозаболеваний намного менее значимый, вследствие чего в ряде стран с высоким уровнем здравоохранения на первое место в причинах смертности выходят именно эти болезни. Так уже произошло в Японии, Гонконге, Сингапуре, Норвегии и ряде других стран с высокими продолжительностью жизни и уровнем здравоохранения. В связи с этим сейчас растет интерес к разработкам новых средств и методов борьбы с онкозаболеваниями, а ученые все больше стремятся найти новые подходы к диагностике, профилактике и лечению этих болезней. В России таких разработок пока что крайне мало, хотя и доля, и абсолютное число раковых заболеваний у нас в стране постепенно растут. В этой связи тема представленной работы весьма актуальна.

Работа Багаманшиной А.В. посвящена изучению свойств нового, перспективного противоопухолевого препарата на основе фрагмента природного человеческого белка – лактаптина. Этот белок – фрагмент каппа-казеина человеческого молока – вызывал избирательную гибель раковых клеток человека на уровне культур клеток. Поскольку его природный

источник в значительных количествах труднодоступен, то кодирующий его ген был клонирован в *E.coli* с целью получения штамма-продуцента этого белка-аналога RL2. Однако, оказалось, что удельная активность прокариотического аналога намного ниже его природного прототипа. Поскольку точные механизмы действия этого белка на раковые клетки не были установлены, то существовала необходимость исследовать эти механизмы и оценить его противоопухолевый потенциал, а также сравнить его с эукариотическим аналогом, продуцент которого был также сконструирован при участии автора работы.

Научная новизна и практическая значимость исследования

В процессе выполнения диссертационной работы Багаманшиной А.В. были прояснены основные механизмы противоопухолевого действия прокариотического аналога лактапина, впервые разработан его эукариотический продуцент и также изучены его основные свойства в сравнении со свойствами прокариотического аналога. Кроме того, выявлено, что цитотоксическая активность прокариотического аналога лактапина в комбинации с модуляторами аутофагии в отношении опухолевых клеток человека ингибиторы аутофагии хлорокин, Ku 55933 и индуктор аутофагии рапамицин повышается синергетически. Продемонстрировано также противоопухолевое действие этого аналога в отношении опухолевых моделей различной локализации у мышей: подкожной, внутримышечной и внутрибрюшинной. Наконец, показано, что рекомбинантный эукариотический аналог лактапина EL1 обладает цитотоксической активностью в отношении широкого спектра культур клеток опухолей человека.

В итоге полученные рекомбинантные аналоги лактапина с большой вероятностью могут стать основой новых противораковых препаратов

Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов

Полученные Багаманшиной А.В. результаты имеют большое фундаментально-прикладное значение для прояснения защитных механизмов человеческого организма в отношении раковых заболеваний.

В практическом плане в диссертационной работе Багаманшиной А.В. разработан эукариотический продуцент аналога белка лактапина и показаны противоопухолевые свойства этого белка, что делает его перспективным для проведения доклинических и, возможно, клинических испытаний в качестве нового противоопухолевого средства.

Степень обоснованности научных положений и выводов

Диссертационная работа Багаманшиной А.В. выполнена на высоком методическом уровне, использованы современные методы молекулярной и клеточной биологии, биохимии и генетической инженерии. Результаты исследований получены с использованием современного оборудования, экспериментальные данные хорошо задокументированы и подвергнуты правильной статистической обработке. Достоверность данных не вызывает сомнений. Выводы обоснованы и напрямую вытекают из полученных в ходе экспериментов результатов, соответствуют поставленным целям и задачам исследования.

Результаты диссертационной работы опубликованы в 4 статьях в высокорейтинговых журналах и доложены на ряде международных и российских конференций.

Структура работы

Структура диссертации традиционна. Диссертация содержит следующие разделы: «Введение», «Список сокращений», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть» (состоит из подразделов «Материалы и оборудование», «Методы»), «Результаты и обсуждение»,

«Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 137 страницах текста и проиллюстрирована 42 рисунками и 10 таблицами. Список литературы насчитывает 235 источников.

Во «Введении» убедительно обоснована актуальность выбранной темы, четко определены задачи исследования, которые полностью отражают подходы для достижения поставленных целей.

«Обзор литературы» посвящен классификации и описаниям онкотерапевтических препаратов на основе полипептидов и белков и является весьма полезным для тех специалистов, кто занимается поиском и дизайном противораковых препаратов белковой природы.

Раздел «Материалы и оборудование» содержит подробную информацию обо всех использованных реактивах, материалах и оборудовании. Приведена также вся необходимая информация об использованных в работе штаммах бактерий, плаزمиды, культурах клеток. Приведен подробный состав всех применявшихся буферных растворов и культуральных сред. Используемые в работе методы описаны подробно, демонстрируют высокий экспериментальный уровень представленной работы и адекватны поставленным задачам.

В главе «Результаты и обсуждение» Багаманшина А.В. подробно и детально описывает дизайн исследования, схемы экспериментов и их результаты.

В итоге автором получены следующие результаты:

1. Выявлено, что прокариотический аналог лактапина индуцирует апоптоз клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, обусловленный, по всей видимости, негативной регуляцией убиквитинлигазы MDM2, позитивной регуляцией про-апоптотического белка BAX, негативной регуляцией антиапоптотического белка Bcl-2 и несогласованной активацией генов каскада NF- κ B.

2. Этот же аналог индуцирует аутофагию опухолевых клеток, что подтверждено образованием специфических для аутофагии ультраструктур: фагофоров, аутофаголизосом и мультивезикулярных телец, а также изменением ключевых белковых маркеров аутофагии: процессингом белка LC3, негативной регуляцией белка p62 и позитивной регуляцией белка ATG5.

3. Показано, что известные ингибиторы аутофагии хлорокин и Ku 55933 и индуктор аутофагии рапамицин усиливают цитотоксическое действие прокариотического рекомбинантного аналога лактапина RL2 с синергетическим эффектом.

4. Выявлено, что прокариотический рекомбинантный аналог лактапина оказывает противоопухолевое действие в отношении опухолевых моделей различной локализации у мышей: подкожной, внутримышечной и внутрибрюшинной при суммарной дозе препарата RL2 40 – 240 мг/кг.

5. Показано, что эукариотический рекомбинантный аналог лактапина также обладает цитотоксической активностью в отношении широкого спектра культур клеток опухолей человека в диапазоне концентраций 50-375 нг/мл.

Далее представлены «Заключение» и «Выводы», сделанные в результате проведенной работы. Выводы, сделанные автором, хорошо аргументированы и соответствуют поставленным задачам. Список литературы исчерпывающ.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Разработанный препарат и технология его наработки и выделения целесообразно довести хотя бы до доклинических испытаний, а затем и до клинических испытаний, поскольку препарат является перспективным для внедрения в производство и в медицинскую практику.

Замечания и вопросы по содержанию работы

Серьезные замечания к диссертационной работе отсутствуют, дальнейшие комментарии носят в основном стилистический характер. В частности, в тексте работы выявлен ряд неточностей, а именно:

1. На стр. 1 автореферата сказано: «Стоит отметить, что существующий процесс наработки аналога лактапина RL2 в системе E.coli и его дальнейшая очистка для получения лекарственной формы приводят к значительному снижению удельной активности препарата по сравнению с оригинальным лактапином из молока человека.». Непонятно, на каком основании был сделан вывод о том, что сам процесс наработки привел к снижению активности. Да и вторая часть этого предложения также не обоснована. А вернее всего более низкая, в сравнении с природным, активность прокариотического аналога лактапина связана с тем, что в прокариотах белки не подвергаются посттрансляционной модификации. Об этом позже говорится в тексте, причем только в части возможного фосфорилирования, но почему об этом сразу здесь нельзя было не сказать?
2. На стр. 3-4 автореферата есть фраза «Таким образом, показано, что в клетках MDA-MB-231 RL2 вызывает гибель с признаками апоптоза». По всей видимости, имелось в виду, что аналог лактапина RL2 вызывает гибель самих клеток, а не чего-то в них.
3. На стр. 114 диссертационной работы имеются два идущих друг за другом предложения: «Обнаружено, что в образцах кондиционированной ростовой среды клеток HEK293T, трансфицированных плазмидами pEL1 и pEL2, моноклональные антитела к RL2 выявляют единственную полосу, которая соответствует расчетной массе рекомбинантных аналогов

лактапина EL1 и EL2 - 14 кДа (Рис. 40). Под термином «кондиционированная среда» подразумевали культуральную среду от трансфицированных клеток НЕК293Т в логарифмической фазе роста, не содеожащую клеток-продуцентов.» (авторский текст). Между тем термин «Кондиционированная культуральная среда» давно известен, широко используется и означает следующее (источники - <http://sputnic-group.ru/cellmedium/> и <https://chem21.info/info/1381278/>): ««Кондиционированная среда (Conditioned Medium) – содержит секретируемые клетками факторы роста, белки и цитокины, например, “Бесклеточный культуральный супернатант”. Используется для “привередливых” и “требовательных” клеток, которым требуются специфические вещества-медиаторы, чтобы расти, или чтобы их захватывать.» ЗАЧЕМ понадобилось вводить свои собственные определения, которые только запутывают специалистов? Почему нельзя было просто написать «в пробах культуральной жидкости после XYZ часов инкубирования с клетками-продуцентами...»?

Заключение

В диссертационной работе были проведены работы по сравнительной оценке противораковых свойств различных препаратов на основе белка лактапина, а также получению эукариотического продуцента этого белка и оценке его свойств. Работа Багаманшиной А.В. хорошо продумана, правильно и логично выстроена, написана понятным языком и заслуживает положительной оценки. Для выполнения поставленных задач был проделан большой объем работ с использованием самых современных методов. Результаты были доложены на нескольких международных и российских конференциях, представительно опубликованы в высокорейтинговых журналах и защищены одним патентом.

Данная диссертационная работа полностью соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 «Положения о присуждении учёных степеней в ИХБФМ СО РАН», так как полученные в диссертации данные вносят существенный вклад в создание и изучение новых перспективных противораковых препаратов, а ее автор, Багаманшина Анастасия Викторовна, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент,
Заведующий Лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и вирусологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ),
доктор биологических наук, профессор
член-корреспондент РАН

С.В. Нетёсов

Подлинность подписи С.В. Нетёсова заверяю:
Ученый секретарь НГУ, к.х.н.

Е.А.Тарабан

22 января 2020 года



630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет». Тел (383) 363-43-33. <http://www.nsu.ru>

Нетёсов Сергей Викторович. Тел. (383) 363-4203; сот.: +7-913-910-0843.
Эл. почта svn15@hotmail.com и netesov.s@nsu.ru.