

ОТЗЫВ
официального оппонента
доктора биологических наук

Рыковой Елены Юрьевны на диссертацию

Мохамеда Ислама Сабер Еада

«Молекулярные механизмы, опосредующие противоопухолевую активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *Bacillus pumilus* (биназы)», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Актуальность темы

Открытое в 50-х годах прошлого века токсическое действие экзогенных рибонуклеаз (РНКаз) на опухолевые клетки послужило поводом для изучения этих ферментов в качестве противоопухолевых препаратов. Были обнаружены экзогенные РНКазы различного происхождения, имевшие цитотоксическую и противоопухолевую активность. За последние 10 лет на различных мышинных моделях опухолей были получены данные о высоком противоопухолевом и антиметастатическом потенциале бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *Bacillus pumilus* (биназы). Открытие внеклеточных РНК, циркулирующих в крови, выяснение их роли в опухолевой прогрессии и распространении метастазов позволило предположить, что циркулирующие РНК вместе с внутриклеточными РНК могут быть молекулярными мишенями РНКазы А и других экзогенных РНКаз.

Накоплено большое количество данных о влиянии РНКазы А на прогрессирование опухоли *in vivo*, однако лишь несколько исследований были посвящены тому, что происходит в опухолевых клетках *in vitro*. Свойства биназы больше изучены в экспериментах *in vitro*, чем *in vivo*. Остается открытым вопрос о возможных РНК-мишенях РНКазы А и биназы на уровне опухолевой клетки и организма. Таким образом, выяснение ключевых этапов взаимодействия экзогенных рибонуклеаз биназы и РНКазы А с опухолевыми клетками *in vitro* и *in vivo* является крайне актуальным.

Научная новизна полученных результатов

В представленной диссертационной работе впервые показано, что РНКазы А эффективно накапливаются в клетках меланомы В16 мыши и клетках эпидермоидной карциномы шейки матки HeLa человека. После проникновения РНКазы А в клетки HeLa и В16 часть фермента остается свободной, не связанной с ингибитором рибонуклеаз, что приводит к снижению уровня цитозольных РНК в обоих типах клеток и рРНК в ядрышках клеток HeLa. Оригинальные эксперименты по ко-локализации РНКазы А с внутриклеточным гетеродимерным белком Ku70/Ku80 указывают на возможность образования комплекса РНКазы А с белком Ku70/Ku80 внутри клеток. Этот результат позволил автору предполагать участие белка Ku70/Ku80 во внутриклеточном транспорте РНКазы А.

Показано, что РНКазы А подавляет миграцию и инвазию опухолевых клеток *in vitro*, но не подавляет их жизнеспособность; биназа снижает жизнеспособность опухолевых клеток за счет индукции апоптоза и подавляет их миграцию. Впервые на

метастатической модели меланомы B16 *in vivo* показано, что РНКазы А подавляют метастазирование в легкие, меняют профиль микроРНК и экспрессию маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП-маркеров) в ткани, прилегающей к очагам метастазирования, разрушая формирование благоприятного микроокружения опухоли. На модели лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS₄₀ показано, что биназа замедляет рост первичной опухоли, подавляет развитие метастазов в печени и меняет профиль микроРНК в опухолевой ткани, что сопровождается снижением в ней реактивной воспалительной инфильтрации и количества митозов.

Использование биоинформатического анализа в совокупности с собственными экспериментальными данными позволило установить, что основными биологическими процессами, модулируемыми РНКазой А в микроокружении опухоли, являются регуляция клеточной адгезии, а также сигнальные пути, связанные с ЭМП и опухолевой прогрессией. Основными событиями, модулируемыми биназой в опухолевой ткани, являются пролиферация, миграция, апоптоз и сигнальные пути, связанные с опухолевой прогрессией.

Автором на опухолевых моделях *in vivo* выявлен ряд микроРНК опухолевой ткани и метастатических очагов, которые являются перспективными кандидатными маркерами ответа на лечение и мишенями для ген-направленной терапии. Показан высокий антиметастатический потенциал бычьей панкреатической РНКазы А на модели метастатической меланомы B16, характеризующейся высокой агрессивностью и скоростью диссеминации, что позволяет рассматривать РНКазу А как потенциальный препарат для терапии метастазирующих опухолей.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа представлена на 145 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 27 рисунков. Библиография включает 310 наименований.

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

Глава 1, содержащая обзор литературы, посвящена рибонуклеазам с известным противоопухолевым и противовирусным действием. В ней обсуждены механизмы их цитотоксичности и противоопухолевой активности. Подробно рассмотрены РНКазы с противоопухолевой активностью, принадлежащие семейству РНКазы А и РНКазы T1, РНКазы с противовирусным действием, противоопухолевые РНКазы, находящиеся в клинических испытаниях.

Глава 2 подробно описывает подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования. В работе использовали несколько линий клеток, культивируемых *in vitro*, и модели опухолей на мышах *in vivo*, работа выполнялась в соответствии с этическими протоколами. Работа проведена с использованием разнообразных методов, в том числе, выделения и оценки количества РНК, оценки миграции и инвазии опухолевых клеток, проточной цитофлуориметрии, конфокальной микроскопии, молекулярного моделирования и биоинформатического

анализа. Все методы являются современными и адекватными для решения поставленных задач, что определяет надежность полученных результатов.

Глава 3 представляет результаты исследования влияния РНКазы А и биназы на снижение злокачественного потенциала опухолей как *in vitro*, так и *in vivo*, результаты поиска микроРНК, чувствительных к биназе и РНКазе А, их биоинформатический анализ и обсуждение полученных результатов. На основании полученных экспериментальных данных и данных биоинформатического анализа автором предложен механизм противоопухолевой активности РНКазы А и биназы. Описание результатов раскрывает логику исследования, иллюстративный материал представлен рисунками и таблицами, которые облегчают восприятие материала.

Достоверность и обоснованность полученных результатов

Высокая степень достоверности результатов определяется значительным объемом экспериментального материала, полученного с использованием современных методов и подходов, статистической обработкой данных с использованием корректно подобранных критериев и тестов. Исследования, проведенные на животных по определению противоопухолевой активности и безопасности препаратов, подтверждены на молекулярном, биохимическом, гистоморфологическом уровнях. Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Автор выносит на защиту шесть научных положений, логично вытекающих из анализа результатов. Материал, представленный в диссертационной работе, получен и проанализирован автором исследования лично, либо при его непосредственном участии. Автореферат диссертации соответствует ее содержанию.

Результаты исследования апробированы на российских и международных конференциях, по теме диссертации опубликовано 3 работы, из них 1 публикация в рецензируемом научном журнале из списка рекомендованных ВАК РФ и 2 публикации в международных научных журналах, включенных в список базы данных Scopus и Web of Science.

При прочтении работы возникли вопросы дискуссионного характера.

1. Вопрос связан с исследованием внутриклеточного накопления и локализация РНКазы А. Для визуализации накопления и распределения в клетке РНКазы А Мохамед И.С. использовал конъюгат РНКазы А-биотин. Визуализацию проводили после 4-х часов накопления в клетках *in vitro* с использованием Streptavidin-APC, при этом автор не приводит данные о накоплении и визуализации свободного биотина в тех же условиях. Какие есть основания полагать, что в клетке не происходит расщепление конъюгата РНКазы А-биотин, и наблюдаемая локализация Streptavidin-APC не связана с распределением свободного биотина, а является следствием распределения исходного конъюгата?

2. В экспериментах на опухолевых моделях использованы значительно различающиеся дозы РНКазы А и биназы, в случае биназы существенно более высокие. Можно предполагать, что введение значительного количества биназы в организм (миллиграмм на кг веса) в качестве противоопухолевого агента может привести к нежелательной нагрузке на иммунную систему организма, и спровоцировать активацию

иммунного ответа на чужеродный белок бактериального происхождения. Что известно об иммуногенных свойствах экзогенных РНКаз микробного происхождения?

Заключение

Диссертация Мохамеда Ислама Сабер Еада «Молекулярные механизмы, опосредующие противоопухолевую активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *Bacillus pumilus* (биназы)», выполненная в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, является законченной научно - практической работой. На основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно определить, как новое достижение в молекулярной биологии. В диссертации решается актуальная проблема – выяснение молекулярных механизмов, опосредующих противоопухолевую активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *B. pumilus* (биназы).

В целом по актуальности темы, объёму, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медициной СО РАН к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3 – Молекулярная биология, а также критериям, определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медициной СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медициной СО РАН. Автор диссертации, Мохамед Ислам Сабер Еад, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Официальный оппонент

доктор биологических наук,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», в.н.с.

Рыкова Елена Юрьевна

Адрес организации: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Адрес: 630090, Россия, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева 10.

<http://www.bionet.nsc.ru>, Рыкова Елена 2014@bionet.nsc.ru

Подпись д.б.н. Рыковой Е.Ю.

Завещаю Ученый секретарь ИЦиГ СО РАН

Кандидат биологических наук



Орлова Г.В.

22. 06. 2022