

**ОТЗЫВ
ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора биологических наук, профессора
Толстиковой Татьяны Генриховны на диссертационную работу
Мохамеда Ислама Сабер Еада

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

Актуальность темы исследования

На протяжении более 50 лет рибонуклеазы (РНКазы) являются традиционными объектами исследования молекулярной биологии, поскольку они участвуют в ключевых процессах реализации генетической информации и представляют собой важнейшие ферменты клеточного метаболизма. В настоящее время большое внимание обращено к изучению функций РНКаз, связанных с регуляцией экспрессии генов, ростом и дифференцировкой клеток, защитой от патогенов, индукцией апоптоза. Эти ферменты находят широкое применение в генной инженерии, биохимии и медицине. Кроме того, они являются удобными объектами для изучения механизмов реализации высокой специфичности ферментов. Известно, что некоторые РНКазы семейства РНКазы А (РНКазы семенников быка - BS-РНКазы, ооцитов лягушки *Rana pipiens* - онконаза), токсичны для клеток млекопитающих, особенно для опухолевых клеток. Они избирательно атакуют злокачественные клетки, запуская апоптоз, и поэтому могут рассматриваться как альтернатива классическим химиотерапевтическим препаратам. Микробные РНКазы *Streptomyces aureofaciens* (РНКазы Sa3), *Bacillus intermedius* (биназа) составляют важное семейство РНКаз, представители которого также обладают цитотоксическими свойствами, а одним из значимых факторов цитотоксичности по отношению к клеткам млекопитающих является их невосприимчивость к действию цитоплазматического ингибитора РНКаз, присутствующего практически во всех тканях человека и блокирующего каталитическую активность экзогенных РНКаз животного происхождения. Несмотря на большой интерес исследователей к цитотоксичным РНКазам, механизмы, определяющие их цитотоксичность, до сих пор недостаточно изучены, особенно мало сведений о начальных этапах взаимодействия экзогенных РНКаз с опухолевой клеткой.

Диссертационная работа Мохамеда Ислама Сабер Еада, посвящённая выяснению молекулярных механизмов взаимодействия экзогенных рибонуклеаз биназы и РНКазы А с опухолевыми клетками в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, является, несомненно, актуальным исследованием.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования.

Впервые на основании биоинформатического анализа с наложением экспериментальных данных проведена функциональная аннотация генов-мишеней миРНК, чувствительных к РНКазе А и биназе и показано, что: основными биологическими процессами, модулируемыми миРНК, чувствительными к РНКазе А, в микроокружении опухоли являются регуляция клеточной адгезии, а также сигнальные пути, связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом и опухолевой прогрессией. Для миРНК, чувствительных к биназе, в опухолевой ткани - являются процессы пролиферации, апоптоза, миграции и сигнальные пути, связанные с опухолевой прогрессией.

Практическая значимость работы состоит в том, что на опухолевых моделях *in vivo* выявлен ряд миРНК опухолевой ткани и метастатических очагов, которые могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров ответа на лечение и мишеней для ген-направленной терапии онкобольных.

Доказанный высокий антиметастатический потенциал бычьей панкреатической РНКазы А на модели метастатической меланомы мыши, характеризующейся высокой агрессивностью и скоростью диссеминации, позволит рассматривать эту РНКазу как перспективный препарат для терапии метастазирующих опухолей.

Структура и объем диссертации

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

Во введении автор убедительно обосновал актуальность темы, постановку цели и задачи исследования.

Литературный обзор полностью раскрывает мировую значимость исследований Мохамеда Ислама Сабер Еада, которым посвящена диссертационная работа, а именно, очень обстоятельно дается материал об экзогенных рибонуклеазах животного и микробного происхождения с противоопухолевым и противовирусным действием, обсуждаются механизмы их цитотоксичности и противоопухолевой активности. Делается акцент на том, что в отличие от цитотоксических РНКаз млекопитающих, принадлежащих к семейству РНКазы А, микробные РНКазы принадлежат к семейству РНКазы Т1 и не чувствительны к действию ингибитора рибонуклеазы, обладают широким спектром возможностей для

экономически малозатратной биоинженерии, поэтому они особенно привлекательны в качестве препаратов с противоопухолевой активностью. Дается характеристика четырех интересных в качестве объектов исследований микробных РНКаз, принадлежащих к микробному семейству РНКаз N1/T1 таких как: барназа *B. amyloliquefaciens* (молекулярная масса 12.38 кДа, 110 аминокислотных остатков), биназа *B. pimulus* (молекулярная масса 12.4 кДа, 109 аминокислотных остатков), балифаза *B. licheniformis* и бальназа из *B. altitudinis* (молекулярная масса 12-12.5 кДа, 109 аминокислотных остатков). Отдельно рассматриваются РНКазы из грибов *Aspergillus giganteus*, иначе известные как риботоксины - α -сарцин, митогиллин и рестриктоцин Многочисленными исследованиями показано, что опухоль-ассоциированные РНК являются мишенями экзогенных РНКаз в опухолевых клетках.

Благодаря природной способности рибонуклеаз расщеплять РНК, они давно рассматриваются исследователями как перспективные противоопухолевые препараты. Однако, уязвимыми недостатками РНКаз для разработки на их основе противоопухолевых препаратов является их фармакокинетические особенности, связанные с их белковой природой и небольшими размерами, что способствует легкому выведению из организма.

В последние несколько лет были предложены различные подходы, такие как димеризация или мультимеризация, конъюгация, и большинство из них направлено на использование в комбинации с различными наноносителями. Это вероятно, позволит получить селективные негенотоксичные противоопухолевые препараты, которые могут воздействовать на многофакторный фенотип опухолевой клетки и ее окружения.

Глава «Материалы и методы исследования» изложена на 22 страницах, где автор работы приводит подробное описание всем подготовительным процессам для проведения исследований, дает характеристику использованных реактивов, биохимических реагентов, дизайн введения веществ экспериментальным животным, используемых штаммов опухолей, подробное описание современных методов, приборной базы, что позволяет уже оценить масштабность, объем и уровень проведенных исследований.

В главе «Результаты и обсуждение» содержится изложение полученных результатов и аргументированный анализ их в сравнение с литературными источниками.

Хотелось остановить внимание на отдельных и важных результатах, полученных при исследований, как *in vitro*, так и *in vivo*, а именно: исследование влияния РНКазы А на жизнеспособность опухолевых клеток проводили с помощью МТТ теста на семи линиях различной степени злокачественности опухолевых клеток человека и мыши -

аденокарцинома легких A549, эпидермоидная карцинома шейки матки HeLa, гепатоцеллюлярная карцинома HepG2, рак молочной железы MCF-7 и аденокарцинома двенадцатиперстной кишки HuTu80 человека, а также суспензионная культура лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS40 и культура меланомы B16 мыши. Далее в работе объектами исследования в экспериментах *in vitro* были клетки RLS40 и B16, поскольку именно на этих опухолевых моделях выполняли исследование противоопухолевой и антиметастатической активности биназы и бычьей панкреатической РНКазы А *in vivo*.

Было установлено, что РНКазы А эффективно накапливаются в виде конъюгата с биотином в клетках меланомы B16 мыши и эпидермоидной карциномы шейки матки HeLa человека. После проникновения РНКазы А в клетки HeLa и B16 часть фермента остается не связанной с ингибитором рибонуклеаз, что приводит к снижению уровня внутриклеточных РНК в обоих типах клеток. РНКазы А подавляет миграцию и инвазию ряда опухолевых клеток *in vitro*, но не влияет на их жизнеспособность. Биназа снижает жизнеспособность опухолевых клеток человека (легких A549, печени HepG2, молочной железы MCF-7 и двенадцатиперстной кишки HuTu 80) за счет индукции апоптоза и подавляет их миграцию.

В исследованиях *in vivo*: РНКазы А подавляет метастазирование в легкие мышей с метастатической меланомой B16, меняет профиль миРНК и экспрессию ЕМТ-маркеров в ткани, прилегающей к очагам метастазирования, разрушая формирование благоприятного микроокружения опухоли. Биназа замедляет рост первичной лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS40, подавляет развитие метастазов в печени и меняет профиль миРНК в опухолевой ткани, что сопровождается снижением в ней пролиферативного потенциала. Во время терапии биназой были установлены морфофункциональные изменения селезенки и тимуса, что указывают на неспецифическую активацию иммунной системы.

С помощью биоинформатического анализа с наложением экспериментальных данных проведена функциональная аннотация генов-мишеней миРНК, чувствительных к РНКазе А и биназе и показано, что: основными биологическими процессами, модулируемыми миРНК, чувствительными к РНКазе А, в микроокружении опухоли являются регуляция клеточной адгезии, а также сигнальные пути, связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом и опухолевой прогрессией. Для миРНК, чувствительными к биназе, в опухолевой ткани являются пролиферация, апоптоз с активацией ключевых каспазы-3 и каспазы-7, миграция и сигнальные пути, связанные с опухолевой прогрессией.

Все исследования, проведенные на животных по определению противоопухолевой активности и безопасности подтверждены на молекулярном, биохимическом, гистоморфологическом уровнях.

Работа завершается обстоятельными выводами, отражающими полученные в ходе исследования результаты. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и подходов, соответствующих поставленным задачам. Автореферат диссертации соответствует ее содержанию.

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

Принципиальных замечаний по работе нет.

В качестве дискуссии хотелось получить ответы на следующие вопросы:

1. Является ли обнаруженная в эксперименте неспецифическая активация иммунной системы под влиянием биназы положительным фактом при онкотерапии?
2. Является ли биназа специфичной при лечении только лимфосаркомы RLS₄₀?
3. Почему все-таки выбор пал на РНКазу А животного происхождения как перспективный антиметастатический препарат, а не на биназу?
4. Возможно ли комплексная терапия при сочетании РНКаз разного происхождения?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Мохамеда Ислама Сабер Еада «Молекулярные механизмы, опосредующие противоопухолевую активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *Bacillus pumilus* (биназы)», выполненная под руководством доктора биологических наук Мироновой Надежды Львовны 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 биохимии, молекулярной биологии. В диссертации решается актуальная проблема - изучение молекулярных механизмов, опосредующих противоопухолевую активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *B. pumilus* (биназы). В частности, впервые доказано, что

основными биологическими процессами, модулируемыми РНКазой А в микроокружении опухоли, являются регуляция клеточной адгезии, сигнальные пути, связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом (EMT) и опухолевой прогрессией, а модулируемыми биназой - пролиферация, миграция, апоптоз и сигнальные пути, связанные с опухолевой прогрессией.

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 Института 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
профессор, доктор биологических наук,
заведующая лабораторией
фармакологических исследований
Отдела медицинской химии
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Новосибирского института
органической химии им. Н.Н. Ворожцова
Сибирского отделения
Российской академии наук

Толстикова
Татьяна Генриховна

630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 9
тел.: 8(383)330-07-01, вн. тел. 2-49
e-mail: tg_tolstikova@mail.ru

Подпись профессора Т.Г. Толстиковой
Заверяю Ученый секретарь НИОХ СО РАН.
к.х.н.



Роман Андреевич Бредихин

14. 06. 2022