

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Рак А.Я. на тему:

«ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИМЮЛЛЕРОВА ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность темы исследования

Значительный успех был достигнут в лечении опухолевых заболеваний с помощью химиопрепаратов, однако потенциал дальнейшего прогресса в этом направлении оказался во многом исчерпанным. В последние годы ведется интенсивный поиск и разработка новых подходов к терапии опухолей. Одним из таких подходов, который заслуживает серьезного внимания, является использование приемов блокирования рецепторов ростовых факторов, экспрессированных на опухолевых клетках. В этом направлении уже достигнуты заметные успехи, в частности, при использовании терапевтических антител, направленных против рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR и HER2), гепатоцитарного фактора роста (HGFR), фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR) и ряда других. Препараты, направленные против рецепторов, могут непосредственно способствовать переходу опухолевых клеток к различным формам апоптоза, а также могут служить компонентами направленного транспорта цитотоксических препаратов к опухолевым клеткам, что позволяет значительно снизить дозы препаратов и, соответственно, нагрузку на здоровые клетки и ткани. Целесообразность подхода к терапии, основанного на связывании рецепторов, обусловила необходимость поиска новых молекулярных мишеней на опухолевых клетках различного гистогенеза.

Рецензируемая работа Рак А.Я. посвящена разностороннему изучению возможностей и условий использования рекомбинантного антимюллера гормона (АМГ) в качестве препарата, связывающего специфические рецепторы на опухолевых клетках, в первую очередь, на клетках рака яичников, а также других опухолях, экспрессирующих рецептор MISRII.

Цели и задачи исследования, пути их решения

Автор рецензируемой работы приводит обоснования важности исследования антимюллера гормона в качестве потенциального терапевтического средства для лечения опухолей, экспрессирующих рецептор этого гормона – MISRII. Единственным надежным источником АМГ для такого использования может быть рекомбинантный белок. Поэтому логика приводит автора работы к необходимости создания воспроизводимой и практичной технологии получения биологически активного АМГ, его

очистки, определения условий сохранения стабильности и контроля биологической активности. Автор формулирует цель своей работы как разработку эффективной технологии получения рекомбинантного АМГ и его производных с последующим исследованием биологических свойств очищенных белков. Для осуществления этой цели автором были четко сформулированы задачи работы, которые охватывали создание инструментов - моноклональных антител для выделения и очистки препаратов рекомбинантного прогормона, а также его активных дериватов, исследование условий стабилизации препаратов, параметров взаимодействия с рецептором, а также сохранения биологической активности и фармакокинетики дериватов рекомбинантного АМГ.

Объем и структура диссертации

Диссертация Рак А.Я. изложена на 137 страницах, содержит 54 рисунка, 2 схемы и 11 таблиц. Библиография включает 177 источников. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов экспериментов, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка цитированной литературы.

Обзор литературы построен логично и является серьезным анализом современных представлений о клеточном происхождении, структуре, функциях АМГ и его рецептора MISRII в пренатальном периоде и во взрослом организме. В обзоре акцентировано внимание на том, что с рецептором эффективно связывается не полноразмерный гормон, а его активированный, частично протеолизированный, дериват. Наибольшей биологической активностью обладает С-концевой фрагмент гормона. В обзоре приводятся данные об экспрессии MISRII в клетках и в тканях в норме, а также о проявлении гиперэкспрессии рецептора в клетках опухолей. Обосновывается представление о том, что MISRII, гиперэкспрессируемый опухолевыми клетками, может служить мишенью для рекомбинантного АМГ. В обзоре сделан акцент на том, что перечень потенциальных мишеней для применения АМГ в качестве перспективного терапевтического средства далеко не ограничивается опухолями яичников или эндометриальных опухолей. Некоторые опухоли молочной железы, аденома простаты, а также эпителиальные клетки рака легкого также экспрессируют MISRII и чувствительны к действию АМГ. Подчеркивается, что в процессе эпителиально-мезенхимного перехода, который сопровождает процесс прогрессии ряда опухолей, сохраняется гиперэкспрессия MISRII опухолевыми клетками. Автором четко обоснована необходимость разработки технологии получения высокоочищенных препаратов биологически активного рекомбинантного АМГ, исследование стабильности такого препарата и его противоопухолевой эффективности в модельных системах.

Безусловной заслугой автора является владение материалом, свободное его изложение, которое подводит к формулированию цели исследования и к постановке задач. Обзор литературы снабжен иллюстрациями.

Работа выполнена с привлечением широкого арсенала методов исследования, таких как гибридная технология, различные варианты иммуноферментного анализа, аналитическая и препаративная хроматография, экспериментальная онкология и другие. Раздел, посвященный их описанию, написан четко, с достаточной степенью подробности, свидетельствующей о том, что соискатель своими руками выполнила основную экспериментальную часть исследования. В ряде случаев для получения более надежных результатов было использовано несколько разных, взаимно дополняющих методов. Полученные автором результаты подвергнуты грамотной статистической обработке, которая позволяет судить об их достоверности и правомочности делаемых выводов.

Раздел, посвященный изложению результатов исследования, написан ясным языком, содержит графические и табличные иллюстрации, а также фотографии и микрофотографии. В работе использованы многочисленные варианты иммуноферментного анализа. Для облегчения понимания их сути рядом с графическим отображением результатов экспериментов даны четкие схемы использованных вариантов анализа, позволяющие оценить приведенную автором трактовку результатов.

В Заключении в сжатой форме изложены наиболее значимые результаты проведенного исследования.

Характеристика результатов и анализ выводов

В построении и выполнении рецензируемой работы четко прослеживается вектор – от постановки цели, которая состоит в создании инструментов и разработке на их основе технологии получения очищенных активных форм рекомбинантного АМГ, до характеристики и испытаний в биологических моделях полученных препаратов.

Изложение результатов начинается с описания иммунохимических характеристик созданных в рамках настоящей работы, а также полученных раньше, моноклональных антител, направленных против эпитопов АМГ и против его рецептора. С помощью синтетических пептидов установлена эпитопная специфичность антител. Выяснено, что два новых антитела против АМГ (АСМIS1 и АСМIS4), наряду с ранее полученным (M1), распознают эпитоп, который маскирован в молекуле прогормона и открывается только после его частичного протеолиза или в С-концевом фрагменте АМГ. Эти антитела позволили разработать технологию комбинированной хроматографической очистки прогормона и его производных, обладающих биологической активностью. Изложенные результаты обобщены в первом выводе. Кроме этого антитела АСМIS1 и АСМIS4

открыли возможность прямой и дифференциальной детекции биологически активных форм АМГ и позволили сконструировать первую, не описанную ранее, тест-систему для количественного определения концентрации активных форм гормона в биологических жидкостях. Эта новая тест-система была использована для оценки уровня активного АМГ в крови людей разного возраста и пола, что послужило данными для формулирования шестого вывода диссертации.

Автором работы была исследована стабильность активных форм рекомбинантного АМГ и было впервые установлено, что гормон, в частности, его С-концевой фрагмент, обладают каталитической активностью, что может приводить к потере их биологической активности. Сайт протеолиза находится в лейциновом мотиве в области 58-го аминокислотного остатка фрагмента. Обнаруженная каталитическая активность не являлась строго специфичной для гормона, она приводила к расщеплению и других, не родственных белков. Помимо констатации этого факта автор работы выяснила, что ингибитором протеолиза может служить апротинин, но не другие, хорошо известные ингибиторы протеаз (PMSF или бензамидин). Изложенные результаты обобщены во втором выводе.

Важными представляются результаты ингибиторных вариантов иммуноанализа с участием антител АСМIS-3, которые позволили установить, что сайт связывания апротинина на молекуле С-АМГ совпадает с участком связывания гормона с его рецептором MISRII.

Отдельный раздел работы посвящен изучению кинетических параметров взаимодействия активированных форм рекомбинантного АМГ с рецептором. С использованием нескольких аналитических методов, взаимно дополняющих друг друга, определены константы диссоциации комплекса, показатели аффинитета взаимодействия лиганда с рецептором.

Сообразуясь с тем, что очищенные препараты рекомбинантного АМГ предназначены в дальнейшем для использования в качестве основы терапевтических препаратов, была всесторонне исследована их биологическая активность. Безусловно сильной стороной работы явилось то, что характеристика биологической активности препаратов рекомбинантного АМГ и его производных была выполнена не только *in vitro* на клеточных линиях, но также на органной культуре *ex vivo* и на двух *in vivo* моделях.

Все задачи, поставленные в работе, успешно решены. Выводы работы соответствуют полученным результатам, сформулированы ясно и корректно.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Рецензируемая работа имеет выраженную практическую направленность. В ходе ее выполнения автором были получены новые факты, которые представляют ценность не только для практического использования, но вносят вклад в теоретические представления о молекулярных механизмах взаимодействия разных форм АМГ с его клеточным рецептором. С теоретической точки зрения новыми и представляющими интерес для эволюционной биологии являются данные о том, что рекомбинантный АМГ человека способен связывать MISRII рецепторы и вызывать гибель клеток других животных, и наоборот, что может трактоваться как показатель недавнего возникновения в эволюции животного мира сигнальных путей с участием АМГ.

Несомненна практическая значимость исследования, в котором разработана эффективная технология получения и очистки препаратов АМГ и его биологически активных производных, а также параметры для контроля их качества. Эта технология предназначена для разработки противоопухолевых препаратов на основе производных АМГ.

Содержание работы достаточно полно отражено в опубликованных статьях, в материалах конференций. По материалам работы была подготовлена заявка на патент, первым автором в которой является соискатель.

Критические замечания и вопросы к дискуссии

Работа написана логично, четко, хорошим научным языком. В процессе ознакомления с текстом появились некоторые вопросы к автору работы.

Из текста обзора понятно, что рецептор MISRII, связывающий АМГ, относится к семейству рецепторов ростовых факторов TGF β . Связывание этого рецептора с АМГ приводит к торможению роста клеток или к их апоптозу. На этот эффект нацелена тактика использования АМГ для лечения опухолей. Автор указывает, что опухолевые клетки, гиперэкспрессирующие MISRII, одновременно несут маркеры стволовых клеток опухолей. В чем биологический смысл гиперэкспрессии рецептора MISRII опухолевыми клетками, с какими еще лигандами он может связываться?

В разделе «Материалы и методы», а также в «Результатах» процесс получения гибридом-продуцентов моноклональных антител против АМГ, а также против его рецептора описан очень кратко. Остается непонятным, какой адъювант был использован, были ли сделаны бустер-иммунизации в течение последней недели перед проведением слияния, как контролировали уровень иммунного ответа на антигены и каким был уровень ответа, что было источником лимфоцитов для создания гибридом? При описании

приготовления препаратов для иммуногистохимического исследования не указано, проводили ли процедуру демаскировки антигенов.

Заключение

Диссертационное исследование Рак А.Я. свидетельствует о том, что его автор является зрелым научным сотрудником, умеющим мотивировать и формулировать задачи исследования, планировать их выполнение с привлечением широкого арсенала методических приемов, статистически обрабатывать получаемые результаты, критически и грамотно их трактовать.

Диссертационная работа Рак А.Я. на тему «Получение и исследование биологических свойств рекомбинантного антимюллерова гормона человека и его производных» полностью соответствует требованиям п.9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней" (утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, с изм., утв. 21.04.2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор – Рак Александра Яковлевна - заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент –

главный научный сотрудник
лаборатории гибридной технологии
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Российский научный центр радиологии и хирургических
технологий им. академика А.М.Гранова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
(197758 Санкт-Петербург, Песочный п, Ленинградская, 70).

Тел. (812)596-84-62, info@rrcrst.ru

доктор биологических наук (специальность 14.00.36 - аллергология и иммунология)

18. 05. 2021

Самойлович М.П.

Подпись д.б.н. Самойлович М.П. заверяю

Ученый секретарь ФГБУ «РНЦРХТ им.акад. А.М.Гранова»

