

УТВЕРЖДАЮ

Директор

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»,

Чл.-корр. РАН, д.м.н., проф.

И.Ю. Коган

«28» апреля 2021 г.

М.П.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального Государственного Бюджетного Научного Учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта» о научно-практической значимости диссертации Рак Александры Яковлевны «Получение и исследование биологических свойств рекомбинантного антимюллера гормона человека и его производных», представленной к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность темы выполненной работы и её связь с соответствующими отраслями науки

Рак яичника (РЯ) является одной из самых опасных онкогинекологических патологий, занимающей пятое место по летальности в общем перечне онкологических заболеваний человека. При этом соотношение заболеваемости к смертности приближается к угрожающему значению 2/3. В связи с этими фактами разработка эффективных подходов к своевременной терапии РЯ является актуальной задачей для практической медицины. В большинстве случаев РЯ опухолевые клетки несут на своей поверхности

рецептор к антимюллерову гормону (АМГ), а воздействие на данный рецептор с помощью рекомбинантного АМГ (рАМГ) приводит к их гибели, что представляется перспективным подходом к терапии РЯ. При этом важно отметить, что многие особенности биохимии АМГ оставались неизвестными до выхода в печать ряда приоритетных работ А.Я. Рак, посвященных получению различных изоформ АМГ, исследованию их взаимодействия с химерным аналогом рецептора II типа, изучению фармакокинетики, биологической активности рАМГ *in vitro* и воздействия рАМГ на развитие экспериментальных опухолей у мышей, а также исследованию концентрации и степени процессированности изоформ АМГ в сыворотке крови в зависимости от пола, возраста и репродуктивного статуса доноров. Таким образом, диссертационная работа Александры Яковлевны Рак посвящена решению не только сугубо практической проблемы получения рАМГ, способного воздействовать на опухолевые клетки, но и ряда фундаментальных вопросов, касающихся специфики аутопротеолиза рАМГ, сродства к рецептору различных изоформ гормона, образующихся в ходе его посттрансляционного процессинга, особенностей фармакокинетики рАМГ при введении экспериментальным животным, и наконец, половозрастных изменений соотношения уровней активных форм АМГ и общего гормона у здоровых доноров. Учитывая, что перечисленные проблемы рассматриваются впервые, актуальность диссертационной работы не вызывает сомнений.

Связь с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа выполнена в рамках проекта по разработке перспективных подходов к терапии онкогинекологических патологий в ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России. Полученные результаты позволяют обосновать возможность использования рАМГ для проведения доклинических исследований с целью разработки лекарственного средства против РЯ.

Диссертационная работа связана с приоритетными направлениями научно–технологического развития РФ и ответом на «большие вызовы», обозначенные в том числе в пункте 20 «Стратегии научно–технологического развития Российской Федерации»: переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных).

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна выполненных исследований заключается в анализе процесса аутопротеолиза рАМГ, в ходе которого образуется наиболее активное производное гормона - С-концевой фрагмент, обладающий наибольшим сродством к химерному аналогу рецептора АМГ II типа. Более того, А.Я. Рак показала, что дальнейший протеолиз С-концевого гомодимера рАМГ приводит к его инактивации. Автором были разработаны уникальные иммуоферментные тест-системы, позволяющие детектировать активированные и неактивные изоформы АМГ. На основе использования высокоэффективного продуцента рАМГ А.Я. Рак разработан оригинальный метод хроматографической очистки гормона, основанный на принципе тандемной иммуоаффинной хроматографии с использованием двух сорбентов и позволяющий получить препаративные количества рАМГ. Также автором был получен высокоочищенный химерный аналог специфического рецептора АМГ – химерный белок, состоящий из внеклеточного домена рецептора АМГ II типа и Fc-фрагмента иммуноглобулинов класса G1 человека. Связывание такой конструкции с групповым лигандом, специфичным к Fc-фрагменту и иммобилизованным на биосенсоре, было использовано для прецизионного анализа взаимодействия различных изоформ рАМГ с рецептором II типа методом поверхностного плазмонного резонанса. Помимо этого, автором впервые были изучены особенности фармакокинетики рАМГ при различных способах введения

животным. Наиболее предпочтительным при этом оказалось подкожное введение гормона. Биологическая активность полученного рАМГ была продемонстрирована как способность индуцировать регрессию мюллеровых протоков в органной культуре уrogenитальных гребней эмбрионов крыс, так и в отношении опухолевых клеток в культуре и при индукции канцерогенеза у мышей. Полученные автором приоритетные данные могут быть использованы при преподавании курсов биохимии, физиологии, эндокринологии, онкологии в ВУЗах биологического и медицинского профиля: Московский Государственный Университет им. Ломоносова, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12; Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7-9; Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8; Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова, Москва, ул. Трубецкая, д. 8.

Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов

Полученные соискателем результаты важны для современной биохимии, эндокринологии, онкологии, поскольку позволяют углубить представления о природе посттрансляционного процессинга АМГ, характере взаимодействия различных изоформ гормона с рецептором II типа, возможности использования рАМГ для терапевтического воздействия на клетки РЯ и создать платформу для доклинических испытаний рАМГ как потенциального лекарственного средства против онкопатологий гинекологического профиля. Полученные соискателем сведения имеют существенное значение для разработки новых медицинских технологий, ориентированных на диагностику нарушений работы репродуктивной системы и направленную терапию РЯ.

Структура и содержание работы

Рассматриваемая диссертация построена по классическому плану и состоит из разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы исследования, Результаты работы, Обсуждение результатов, Заключение, Выводы, Список сокращений, принятых в тексте, Список литературы. Объем диссертации составляет 137 страниц машинописного текста, перечень цитированной литературы включает 177 тематических источников, большая часть которых представляет собой публикации на иностранных языках за последние 15 лет. Диссертационное исследование проиллюстрировано 54 рисунками, 11 таблицами и 2 схемами.

Раздел «Введение» отражает суть рассматриваемой проблемы, основные положения работы и ее апробацию. Соискателем поставлена цель исследования: «разработка эффективного метода получения рАМГ и его производных с последующим исследованием биологических свойств очищенных белков», которая достигается решением шести задач, отражающих основные этапы выполненной диссертантом работы, путем проведения экспериментов в контролируемых условиях.

Раздел «Обзор литературы» приведены актуальные данные о биохимии АМГ, структуре и тканеспецифичности экспрессии рецептора гормона II типа и опосредуемых им сигнальных каскадах. Рассмотрены современные представления о механизмах взаимодействия АМГ с рецептором, методах получения рАМГ и о возможности его использования для таргетной противоопухолевой терапии.

Методы проведения исследования соответствуют этическим нормам обращения с лабораторными животными, забор биологического материала у доноров производился после получения информированного согласия от пациентов или их законных представителей. Для получения препаратов рАМГ и химерного аналога рецептора гормона II типа, анализа концентрации изоформ АМГ и биологической активности рАМГ соискателем использован широкий спектр молекулярно-биологических, иммунохимических, цитологических

методов и подходов. Анализ процесса протеолитической деградации рАМГ и детальная характеристика образующихся фрагментов белка проведены с использованием как традиционных техник электрофореза, Вестерн-блоттинга, иммуноферментного анализа, так и высокоточного масс-спектрометрического метода (MALDI-TOF/TOF). Для изучения аффинности взаимодействия различных изоформ рАМГ с химерным аналогом рецептора II типа применен как иммуноферментный анализ с последующей обработкой данных по методу Скэтчарда, так и прецизионный метод поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсора. Кроме того, полученные автором моноклональные антитела, специфичные к эпитопу в составе процессированных форм рАМГ, были использованы как для хроматографической очистки гормона, так и для анализа соотношения концентраций изоформ АМГ в образцах сыворотки крови, полученных от доноров различного пола, возраста и репродуктивного статуса.

Разделы «Результаты» и «Обсуждение результатов» составляют значительную часть исследования, в которой автор приводит решение поставленных в начале работы задач и обосновывает справедливость положений, вынесенных на защиту.

Выводы, приведенные после обобщающего раздела «Заключение», четко сформулированы, достаточно обоснованы и подкреплены экспериментальными данными диссертационного исследования, качественно и количественно соответствуют поставленной цели и задачам работы.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Положения, выносимые на защиту, и выводы, сформулированные в диссертации, основываются на экспериментальной работе большого объема, хорошо аргументированы и логически обоснованы. При выполнении работы использованы адекватные поставленным задачам методы исследования, что обуславливает ее высокий научный и методический уровень. Поставленные

диссертантом задачи решены полностью.

Достоверность выводов подкреплена экспериментальным анализом нескольких репликатов, использованием репрезентативных выборок образцов сывороток крови, полученных от здоровых доноров и большого числа экспериментальных животных, которым вводились различные дозы рАМГ для исследования его фармакокинетики. Для обработки всех количественных результатов использованы подходящие статистические методы проверки справедливости нулевой гипотезы с помощью параметрических критериев.

Личное участие соискателя в подготовке диссертации

Диссертантом Александрой Яковлевной Рак были проведены эксперименты, результаты которых после грамотной статистической обработки были использованы как выполнения диссертационной работы, так и для подготовки научных публикаций. Основные результаты диссертации представлены в 10 работах, из которых 9 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, имеется 3 тезиса докладов, подана 1 заявка на патент РФ (№2018119956 от 30.05.2018). Полученные результаты были представлены на всероссийских и международных научно-практических конференциях биохимического профиля. Во всех публикациях по теме диссертации А.Я. Рак является первым автором.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

В процессе выполнения работы диссертантом получены новые данные об особенностях процессинга гормона и возможности использования рАМГ для терапии РЯ. Несомненно, следует продолжить исследования в направлении, обозначенном в данной работе, так как сформированная экспериментальная база может стать основой для проведения доклинических испытаний рАМГ с целью разработки нового противоопухолевого препарата. Полученные автором диссертации сведения целесообразно использовать в исследовательской работе

научных коллективов, занимающихся изучением онкогинекологических патологий и заболеваний репродуктивной системы, таких как Научное отделение онкогинекологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, дом 68, руководитель – профессор, заслуженный врач Российской Федерации, Берлев Игорь Викторович; Лаборатория молекулярной онкологии и иммунологии Томского НИИ онкологии, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, руководитель – д.б.н., заместитель директора по научной работ, профессор Чердынцева Надежда Викторовна.

Замечания к работе

Принципиальных замечаний к диссертации нет. В порядке дискуссии хотелось бы узнать мнение диссертанта по следующему вопросу: насколько консервативными в эволюционном аспекте являются антимюллеров гормон и его рецептор. Можно ли предположить, по данным литературы или исходя из собственных экспериментов автора, что действие рАМГ будет одинаково эффективно проявляться при введении различным видам лабораторных животных?

Заключение

Диссертация Рак Александры Яковлевны на тему «Получение и исследование биологических свойств рекомбинантного антимюллерова гормона человека и его производных», представленная к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия, является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным с использованием современных методов и направленным на решение актуальной проблемы в области биохимии биологически активных соединений и онкогинекологии.

По своей актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов

представленная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор Рак Александра Яковлевна заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.04 – биохимия.

Отзыв о научно-практической ценности диссертации Рак Александры Яковлевны на тему «Получение и исследование биологических свойств рекомбинантного антимюллера гормона человека и его производных» заслушан, обсуждён и одобрен на заседании Учёного совета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», протокол заседания № 4 от 28 апреля 2021 года.

Главный научный сотрудник Отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта"
заслуженный деятель науки РФ, д.б.н., проф.

Арутюнян Александр Варданович

Подпись руки з.д.н. РФ, д.б.н., проф. Арутюняна А.В. заверяю
Учёный секретарь ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»
к.м.н. Капустин Роман Викторович

Почтовый адрес: 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3,
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и
репродуктологии имени Д.О. Отта»
телефон: +7(812) 328-98-68
эл. почта: iagmail@ott.ru