

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук
Анисимова Михаила Николаевича
на тему «Механизмы динамики микротрубочек и её регуляции
низкомолекулярными ингибиторами»
по специальности 1.5.2. Биофизика**

Актуальность темы диссертационной работы М.Н. Анисимова определяется значимостью той роли микротрубочек, которую они играют во множестве клеточных процессов. Наряду с актиновыми и промежуточными филаментами они являются компонентами цитоскелета, обеспечивают внутриклеточный транспорт веществ и органелл кинезином и динеином, участвуют в механизме клеточного деления.

Диссертация М.Н. Анисимова сфокусирована в основном на исследовании динамики роста микротрубочек и механизмах, оказывающих влияние на эту динамику. Для этого автором был разработан и реализован новый метод наблюдения за ростом микротрубочек и регистрации событий их сборки (спасений) и разборки (катастроф). Идея метода состоит в том, чтобы изолировать растущие микротрубочки от контактов с поверхностью стекла экспериментальной ячейки, являющихся неизбежными артефактами традиционно используемого метода. Для этого в новом методе микротрубочки выращивали на пьедесталах высотой 3 мкм, что практически исключало контакты их растущей части со стеклом и существенно изменило статистику спасений.

Ещё одним важным аспектом работы, подтверждающим её актуальность, являются прикладные исследования эффектов целого ряда существующих модуляторов динамики микротрубочек, способных, в частности, ингибировать рост раковых клеток. Разработаны экспериментальные методы поиска новых классов веществ, потенциально применимых для контроля роста микротрубочек. На основе флуоресцентного

зонда кумарин-30 разработан метод скрининга низкомолекулярных ингибиторов тубулина, с помощью которого выявлены новые вероятные ингибиторы динамики микротрубочек.

Положения, выносимые на защиту, научные выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, полностью соответствуют полученным результатам, убедительно обоснованы и обладают несомненной новизной. Достоверность результатов работы подтверждается использованием широкого спектра самых современных экспериментальных подходов, включая несколько видов оптической микроскопии, спектральных методов, термофореза, культивирования клеток с проверкой эффекта ингибиторов роста микротрубочек, проточной цитометрии и тщательного анализа данных.

Обзор литературы предваряет методическую и результативную главы диссертации. Дана общая информация о микротрубочках, о их функциях в клетке, строении, механических свойствах, механизме формирования и динамике их полимеризации/деполимеризации, вводятся понятия катастрофы и спасения. Описаны механизмы регуляции динамики микротрубочек и её известные на сегодняшний день белковые модуляторы.

Подробно описаны используемые методики визуализации и исследования микротрубочек и их динамики, в том числе применение оптических методов, таких как дифференциальная интерференционно-контрастная микроскопия, интерференционная микроскопия отраженного света и микроскопия полного внутреннего отражения с описанием принципов их работы. Приводятся сведения о развитии методик скрининга модуляторов микротрубочек, о поиске противоопухолевых препаратов по анализу их цитотоксичности, а также об общих и специализированных методах исследований, в частности, с использованием флуоресцентных меток.

В целом обзор литературы даёт представление о научной проблеме, вкладу в решение которой посвящена диссертация соискателя, о

существующих достижениях в её изучении и о том, чем данная работа может обогатить знания о динамике микротрубочек и расширить возможности контроля этой динамики.

Разделение глав **Материалы и методы** и **Результаты и их обсуждение** в настоящей диссертации представляется довольно условным, поскольку методы и результаты ней тесно переплетены и в обеих даются описания того и другого. Это не является недостатком работы, скорее неопытностью соискателя, но представляет некоторое затруднение при попытке рецензировать их раздельно. А собственно обсуждение результатов находится в главе Заключение.

Изложение традиционно для такого рода исследований начинается с методов получения белков, их очистки и мечения. Часть процедур по выделению и мечению белков автор выполнял с помощью коллег из дружественной лаборатории. Описаны процедуры приготовления и стабилизации микротрубочек с включением в их состав флуоресцентно меченого тубулина.

Принципиальной методической новизной работы является использование специально разработанных и изготовленных по заказу покровных стёкол с пьедесталами высотой и шириной в 3 мкм. Суть такой модификации состоит в том, чтобы помещая затравку на пьедестале, выращивать микротрубочки так, чтобы их растущая часть не контактировала со стеклом, что является причиной артефактов при использовании классического метода выращивания микротрубочек на стеклянной поверхности проточной камеры. Процедура изготовления стёкол с пьедесталами тщательно описана.

Приведены составы растворов, описания процедур наблюдения за ростом микротрубочек с использованием DIC и флуоресцентной микроскопии, встраивания меченого ГТФ-тубулина в их решётку. Даются сведения о методических проблемах визуализации изображения и борьбы с

ними, для чего был разработан алгоритм его коррекции, включающий в себя аппаратные и вычислительные шаги. Описана процедура количественной оценки включения флуоресцентно меченого ГТФ-тубулина в структуру микротрубочки.

Отдельный раздел методической главы посвящён поиску низкомолекулярных ингибиторов динамики микротрубочек. Настоящей удачей стало обнаружение кумарина-30 – лазерного красителя с флуоресцентными свойствами, оказавшегося аналогом колхицина с аффинностью к его сайту связывания на тубулине. Было установлено, что кумарин-30 эффективно подавляет динамику микротрубочек и деление раковых клеток. Он также конкурирует с колхицином за сайт связывания с тубулином. Основываясь на этом свойстве кумарина-30, а также на усилении его флуоресценции при связывании с тубулином автор разработал новый метод скрининга лигандов, скомбинированный с микротермофорезом.

Метод основан на конкуренции исследуемых веществ с кумарином-30 за связывание с колхициновым сайтом тубулина, регистрируемой по изменению интенсивности флуоресценции при нагревании раствора. Достоинством метода явилась возможность быстрого скрининга лигандов с возможностью классификации их сродства к разными сайтам тубулина.

С помощью этого метода был протестирован целый ряд химических соединений с группировкой их на лиганды колхицинового сайта и лиганды других сайтов связывания и отобраны несколько из них, потенциально обладающих способностью ингибировать рост микротрубочек. Далее эта их способность была подтверждена экспериментально, так же как и подавление роста раковых клеток. Представлен теоретический анализ интерпретации сигнала микротермофореза для случаев лигандов колхицинового сайта связывания и лигандов иных сайтов.

В главе **Заключение** обсуждаются основные результаты диссертационной работы и проведено сравнение с результатами других исследователей. Ещё раз высказаны аргументы в пользу преимуществ

использования стёкол с пьедесталами при изучении динамики сборки и разборки микротрубочек. Обсуждаются также достоинства и перспективы использования вновь разработанного метода скрининга потенциальных модуляторов динамики микротрубочек, основанного на усилении флуоресценции кумарина-30 и при его связывания с тубулином.

Результаты диссертационной работы М.Н. Анисимова опубликованы в нескольких статьях в ведущих международных научных журналах. Автореферат и публикации по теме диссертации адекватно и полно отражают её содержание.

Выводы диссертации в полной мере соответствуют положениям, вынесенным на защиту.

Вопросы и замечание:

1. Почему число спасений примерно на порядок превышает число катастроф? Из общих соображений казалось бы, что каждой катастрофе должно соответствовать не более одного спасения. Наверное, может случиться так, что катастрофу не удастся спасти и, следовательно, количество катастроф, должно, скорее, превышать количество спасений, поскольку нет же необходимости спасать катастрофу несколько раз. Возможно, подсчёт этих событий ведётся каким-то иным способом, чем я себе представляю. Хотелось бы получить комментарий автора.
2. В работе продемонстрировано эффективное подавление деления раковых клеток вновь обнаруженными ингибиторами, связывающимися с колхициновым сайтом тубулина. Касается ли это в той же степени здоровых клеток, или же эти ингибиторы обладают какой-то избирательностью к быстро растущим раковым клеткам?
3. Мне представляется несколько неудачным приводить в диссертации пошаговый протокол скрининга потенциальных лигандов тубулина

(пункт 2.3.7. раздела Материалы и методы), занимающий несколько страниц, да ещё и на конкретном приборе с подробностями его настройки. Тираж диссертации невелик, как и круг её читателей. Полагаю, что такую инструкцию можно выпустить как учебное пособие, либо приложение к прибору, либо, что лучше всего, опубликовать методическую статью, например, в Cell Reports Methods. В диссертации же следовало бы ограничиться принципиальным описанием метода.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.2 – Биофизика (по физико-математическим наукам). Диссертация удовлетворяет критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель, Анисимов Михаил Николаевич, заслуживает присуждения учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика (физико-математические науки).

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
старший научный сотрудник, главный научный сотрудник, заведующий
лабораторией биологической подвижности Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии
Уральского отделения Российской академии наук

Бершицкий Сергей Юрьевич


"20" ноября 2024 г.

Контактные данные:

тел.: +7 (912) 650 6611, e-mail: serg.bersh@gmail.com; s.bershitsky@iip.uran.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена

диссертация:

03.00.02 - Биофизика

Адрес места работы:

620049, Свердловская обл., г. Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106,
ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения
Российской академии наук, лаборатория биологической подвижности
Тел.: +7 (343) 374 0070; e-mail: secretar@iip.uran.ru

Подпись Бершицкого Сергея Юрьевича удостоверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения
Российской академии наук,

к.б.н. Храмцова Юлия Сергеевна,



ПЕЧАТЬ
"20" ноября 2024 г.