

ОТЗЫВ
официального оппонента на диссертацию
на соискание ученой степени кандидата химических наук
Антиповой Ольга Михайловны на тему: «Аптамеры к поверхностным
антигенам CD133 и EGFR для терапии глиом»
по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия (химические науки)

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа Антиповой Ольги Михайловны посвящена исследованию возможностей аптамеров для двух различных клеточных маркеров для терапии глиом. Детальное понимание взаимодействия аптамеров с целевыми клетками обеспечивает обоснованное продвижение аптамеров в качестве молекулярных узнавающих элементов для диагностических и терапевтических целей в онкологии, что определяет высокую теоретическую и практическую значимость работы.

Аптатерапия онкологических заболеваний - новое интенсивно развивающееся направление исследований. Оно предполагает использование аптамеров как для выявления опухолевых клеток, так и для воздействия на них. Важным фактором успеха аптатерапии является выбор клеточного онкомаркера. Поэтому сравнительные исследования, включающие одновременно несколько маркеров очень актуальны. В работе использованы два различных по структуре и функции онкомаркера: рецептор эпидермального фактора роста (англ. EGFR) и поверхностный маркер CD133. Первый белок обеспечивает пролиферацию клеток и опухоли и является фактором агрессии. Предполагают, что второй белок обеспечивает поддержание и пролиферацию стволовых или подобных им клеток. Будучи устойчивыми к стандартным химио- и радиотерапевтическим воздействиям эти клетки отвечают за рецидивы опухоли.

Для аптатераностики важно на качественном и количественном уровне изучить взаимодействие аптамеров с мишенью как в виде белка, так и в составе клеток. Для этого ключевым условием является выбор адекватных парных моделей аптамер - опухолевая клетка.

Степень обоснованности и достоверности полученных научных положений, сформулированных в диссертации

Аптамеры – небольшие молекулы ДНК или РНК, имеющие аффинность и специфичность к какой-либо мишени, включая молекулы, макромолекулы и их комплексы. Аптамеры получают химическим синтезом; их легко модифицировать, например, конъюгацией с различными метками и терапевтическими агентами. Аптамеры хорошо ренатурируют, поэтому не требуют низких температур для хранения и транспортировки. В биомедицинских исследованиях аптамеры показали низкую иммуногенность.

Для селекции аптамеров из комбинаторных библиотек используют как РНК, так и ДНК. Трехмерная структура РНК-аптамеров по сравнению с ДНК-аптамерами может быть более разнообразной из-за наличия 2'-гидроксильной группы. Тем не менее, ДНК-аптамеры могут быть более предпочтительными. Химическая стабильность РНК-аптамеров ниже, чем ДНК-аптамеров. Кроме того, синтез ДНК-аптамеров проще и дешевле. Прямое копирование РНК-аптамеров в ДНК-аптамеры, как правило, не дает положительного результата. Поэтому сравнение аффинности и специфичности РНК- и ДНК-аптамеров, полученных из различных селекций, является актуальной задачей.

Антипова О.М. сравнила аффинность анти-EGFR РНК- и ДНК-аптамеров, полученных в результате различных селекций, и она оказалась сопоставимой. Для этого использовался высокочувствительный метод интерферометрии биослоев и рекомбинантный внеклеточный домен белка (EGFR*). Проточной цитофлуориметрией с клетками EGFR+ показано, что с помощью флуоресцентных производных аптамеров можно проводить титрование клеток

и получать количественные данные об аффинности в виде концентраций полунасыщения.

Существенной особенностью работы является проведение экспериментов с клетками перевиваемых культур, полученных их клинических образцов Биобанка НМИЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. И если стандартные линии клеток с фиксированным количеством маркера позволяют только верифицировать получаемые результаты, то только клинические образцы дают реальную картину взаимодействия с аптамерами.

Анализ аптамеров ко второму исследуемому маркеру, CD133, также проведен на клетках и стандартных линий и культур, полученных от пациентов. И в этом случае, полученные для реальных образцов результаты оказались отличными от таковых для стандартных линейных клеток. Так, например, иммуногистохимический анализ с помощью проточной цитофлуориметрии культуры клеток пациента 107 только указывает на наличие популяционной гетерогенности. Суб5-меченные ДНК-аптамеры Cs5 и Ap1M выявляют такую гетерогенность существенно более эффективно.

Сравнительный анализ взаимодействия аптамеров с клетками, имеющими два типа маркеров, позволяет высказать некоторые общие свойства, например, о наличии порогов обнаружения специфического взаимодействия аптамеров с целевыми клетками, что, по-видимому, может определяться константами взаимодействия. В дальнейшем этот интересный аспект необходимо изучить более подробно.

Для изучения возможности мишень-зависимой таргетной доставки антиролиферативной молекулы в клетку с помощью аптамеров была создана аптамерная конструкция с комплементарным олигонуклеотидом (АККО) на основе анти-EGFR ДНК-аптамера GR20. Существенно, что сборка АККО GR20 проведена количественно, конструкция охарактеризована, она сохранила аффинность как к белку EGFR*, так и к клеткам EGFR+. В АККО GR20 была интеркалирована стандартная антиролиферативная молекула доксорубицина.

Такой комплекс интерниализовался в клетки EGFR+ и давал цитотоксический эффект, отличный от самого доксорубицина.

Достоверность научных выводов

Выносимые на защиту положения базируются на подробном анализе накопленных экспериментальных данных. Все эксперименты и расчеты проведены на высоком уровне с применением самых современных технологий, результаты экспериментов не вызывают сомнения. Протоколы выполненных исследований полно описаны в разделе «Материалы и методы». Ключевые положения диссертации и соответствующие им выводы представляются обоснованными и достоверными.

Результаты диссертационной работы, выносимые на защиту, прошли апробацию на отечественных и международных конференциях.

Результаты работы опубликованы в 5 статьях в реферируемых журналах с высоким импакт-фактором.

Научная новизна исследования

Научная новизна работы состоит, в первую очередь, в системном сравнительном исследовании аптамеров разной химической природы, РНК и ДНК, на различных моделях, как белковых, так и клеточных.

Исследование одновременно двух мишеней позволило выявить общие особенности взаимодействия аптамеров с клетками-мишениями, оценить пороговые значения для количества клеточных мишеней.

Существенной особенностью работы является исследование взаимодействия аптамеров с клетками перевиваемых культур реальных пациентов из Биобанка НМИЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко с различной экспрессией мишени.

Успешно реализован подход для мишень-зависимой таргетной доставки антипалиферативной молекулы доксорубицина в клетки пациента 107 с

помощью аптамерной конструкция с комплементарным олигонуклеотидом на основе анти-EGFR ДНК-аптамера GR20.

Диссертация Ольги Михайловны представляет собой законченное и цельное фундаментальное исследование, выполненное на высоком уровне. Автореферат написан хорошим языком, логично и последовательно, он полностью отражает содержание диссертации.

Замечания

По представленному тексту диссертации можно сделать целый ряд замечаний рабочего характера, однако, мне кажется, более интересно сосредоточиться на самых важных моментах работы.

Например, в работе отмечена существенная разница между параметрами взаимодействия аптамеров с белком и с клетками, которые обладают повышенной экспрессией этого белка. Хотелось бы видеть более подробное обсуждение способов расчета кинетических констант для интерферометрии биослоев для белка и расчетов концентраций полунасыщения для клеток.

Остальные замечания менее существенны и не заслуживают детального обсуждения.

Заключение

В целом, диссертация Антиповой О.М. выполнена на высоком научно-техническом уровне и представляет собой законченную научно-квалификационную работу. Диссертация по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.9. Биоорганическая химия (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно

требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Антипов Ольга Михайловна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия (по химическим наукам).

Официальный оппонент:

доктор химических наук, профессор
профессор кафедры химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

ТИШКОВ Владимир Иванович

24 октября 2025 г