

УТВЕРЖДАЮ



Директор

ФИЦ КНЦ СО РАН

чл.-корр. РАН, д-р с.-х. наук

Александр Артурович Шпедт

Шпедт 2026 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН)

Диссертация «Биолуминесцентный иммуноанализ белка сурвивина в моче при диагностике рака мочевого пузыря» выполнена в лаборатории биолуминесцентных и экологических технологий Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН (ИБФ СО РАН).

В период подготовки диссертации соискатель Панамарев Никита Сергеевич обучался в аспирантуре ФИЦ КНЦ СО РАН и работал в должности младшего научного сотрудника лаборатории биолуминесцентных и экологических технологий ИБФ СО РАН.

В 2022 году окончил магистратуру Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ) по направлению 06.04.01 «Биология». В 2022 году Панамарев Н.С. поступил в аспирантуру в ФИЦ КНЦ СО РАН по научной специальности 1.5.6 – Биотехнология. Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана ФИЦ КНЦ СО РАН в 2026 году.

Научный руководитель – Франк Людмила Алексеевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории биолуминесцентных и экологических технологий ИБФ СО РАН, профессор Базовой кафедры биотехнологии СФУ.

На заседании присутствовали:

Бондарь В.С., доктор биологических наук; Кратасюк В.А., доктор биологических наук; Кудряшева Н.С., доктор физико-математических наук; Франк Л.А., доктор биологических наук; Прудникова С.В., доктор биологических наук; Жила Н.О., кандидат биологических наук; Маркова С.В., кандидат биологических наук; Есимбекова Е.Н., кандидат биологических наук; Еремеева Е.В., кандидат биологических наук; Маликова Н.П., кандидат биологических наук; Красицкая В.В., кандидат биологических наук; Кудрявцев А.Н., кандидат биологических наук; Сапожникова К.Ю., кандидат биологических наук; Посохина Е.Д.; Жукова Г.В.; Вяткина М.О.; Бочарова П.А.; Дудаев А.Е.; Калябина В.П.; Кириллова М.А.

Были заданы следующие вопросы:

1. Что такое безрецидивная выживаемость?
2. Как вы определяли процент включения молекул в биолуминесцентную метку?
3. Какой уровень готовности технологии для внедрения?
4. Какова научная и практическая значимость работы?
5. Можно ли коммерциализировать разработанный Вами анализ сурвивина, с учётом

того, что люцифераза NanoLuc защищена патентом?

6. Зависит ли концентрация сурвивина от стадии рака? От каких вообще показателей зависит концентрация сурвивина у больных в моче?

7. Что такое чувствительность и специфичность? Какие должны быть значения этих параметров для использования маркера в клинической практике?

8. У вас есть набор реагентов в достаточном количестве для измерения 100 клинических образцов?

9. Почему у мужчин рак мочевого пузыря встречается чаще, чем у женщин?

10. Есть ли заболевания, кроме рака мочевого пузыря, при которых уровень белка сурвивина в моче повышен?

11. Какие существуют группы риска, у которых уровень заболеваемости раком мочевого пузыря значительно повышен?

На все вопросы соискатель дал исчерпывающие ответы.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность исследования.

Рак мочевого пузыря (РМП) является девятым по частоте диагностируемым онкологическим заболеванием в России у мужчин и шестнадцатым у женщин. В зависимости от вовлечённости мышечной стенки мочевого пузыря в онкологический процесс данное заболевание делят на немышечно-инвазивный (НМИРМП) и мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (МИРМП). До прорастания опухоли в мышечную стенку РМП медленно прогрессирует и хорошо поддаётся лечению, с возможностью полностью сохранить поражённый орган и высокое качество жизни. Однако высокая склонность к рецидивированию требует тщательного и регулярного наблюдения за состоянием пациентов.

Золотым стандартом для диагностики и мониторинга пациентов является цистоскопия – визуальный осмотр мочевого пузыря и мочевого канала при помощи эндоскопа на наличие новообразований с последующим определением их характера. Данная процедура является дорогостоящим и инвазивным методом, из-за чего болезнь часто выявляют несвоевременно, когда начинают появляться беспокоящие пациентов симптомы – макрогематурия и дизурические расстройства. Дополнением к данному методу служит цитологическое исследование клеточного осадка мочи, представляющее собой изучение структуры элементов мочи под микроскопом для поиска атипичных клеток, указывающих на развитие онкологического процесса. Цитологическое исследование также имеет ряд значимых недостатков: диагностическая эффективность значительно зависит от квалификации проводящего её цитопатолога, метод имеет низкую чувствительность для ранних стадий рака, так как клетки низкой степени злокачественности часто не отличимы от нормальных.

В связи с этим, актуальным является разработка новых, высокочувствительных и неинвазивных методов ранней диагностики и прогностики данного заболевания.

Особый интерес вызывает диагностика РМП, основанная на определении онкомаркеров в моче, куда при контакте с опухолью попадают маркерные молекулы. Это неинвазивный материал для исследования, доступный практически в неограниченном количестве. Перспективным кандидатом в маркеры РМП является сурвивин (BIRC5) – мультифункциональный белок, ингибирующий апоптоз и участвующий в регуляции клеточного деления. Наблюдается значительная экспрессия данного белка в эмбриональных и злокачественных опухолевых тканях, однако в нормальных, терминально дифференцированных тканях сурвивина практически нет, что делает его привлекательным маркером для диагностики онкологических заболеваний. Стоит отметить, что из-за отсутствия стандартных методов обнаружения сурвивина в моче диагностическая чувствительность в

разных исследованиях варьирует от 20 до 70%. По имеющимся на данный момент литературным данным, пороговое значение концентрации сурвивина в моче, позволяющее стратифицировать пациентов с подозрением на РМП и здоровых людей находится на уровне нескольких пМ. Т.е. аналитическая система для выявления такой низкой концентрации мишени в образце должна иметь очень высокую чувствительность.

В Институте биофизики СО РАН на протяжении более чем 50 лет проводятся исследования биолюминесценции морских организмов и изучаются способы её практических приложений. Основными ферментами, обеспечивающим биолюминесценцию у многих известных на сегодняшний день морских обитателей, являются целентеразин-зависимые люциферазы, представляющие собой одноцепочечные глобулярные белки (16-35 кДа), катализирующие реакцию окисления субстрата целентеразина молекулярным кислородом с выделением CO_2 и излучением кванта голубого цвета ($\lambda_{\text{max}}=470-490$ нм). Благодаря высокому квантовому выходу биолюминесцентной реакции и низкому уровню шумового сигнала, возможно создание высокочувствительных молекулярных аналитических систем с использованием данных белков в качестве репортёрных молекул. Получены рекомбинантные аналоги целентеразин-зависимых люцифераз и их различные генетически-модифицированные варианты с новыми полезными свойствами, химически синтезированы и коммерчески доступны субстрат и его синтетические варианты. Показана перспективность использования этих люцифераз как репортеров для высокочувствительного молекулярного анализа различных диагностически важных соединений. Это создает основу для разработки высокочувствительного анализа онкомаркера сурвивина в моче и исследования его пригодности при диагностике рака мочевого пузыря.

Цель работы – создание высокочувствительного биолюминесцентного способа выявления сурвивина в моче и установление перспективности данного маркера для диагностики и прогнозирования рака мочевого пузыря.

Научная новизна.

Получены новые биоспецифические репортёрные молекулы и изучены их свойства; разработан дизайн биолюминесцентного высокопроизводительного иммуноанализа белка сурвивина в моче; показана взаимосвязь между концентрацией сурвивина в образцах и диагнозом заболевания, а также клинико-морфологическими характеристиками опухоли, такими как степень инвазии, степень дифференцировки, размер опухоли и рецидивирование. Установлено, что для выявления ранних стадий заболевания РМП необходимо определять в моче пациентов одновременно сурвивин и онкомаркер CYFRA 21-1.

Практическая значимость.

Разработан высокопроизводительный способ выявления сурвивина для быстрой неинвазивной диагностики заболевания органов мочеполовой системы. Все составляющие аналитической системы отечественного происхождения, что делает анализ доступным для проведения широких скрининговых исследований пациентов групп риска, осуществления мониторинга проводимого лечения, своевременного обнаружения рецидива заболевания. Наличие установленного повышенного уровня сурвивина в анализируемых образцах является обоснованием для формирования групп пациентов повышенного онкологического риска и назначения более глубокого обследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработан дизайн высокопроизводительного биолюминесцентного иммуноанализа сурвивина в образцах мочи на основе люциферазы NanoLuc. Метод способен выявлять концентрации исследуемого белка в диагностически значимом диапазоне концентраций, с пределом обнаружения аналита 10,6 пг/мл (0,6 пМ).

2. Показано, что содержание сурвивина имеет высокую диагностическую значимость и соответствует диагнозу заболевания РМП, установленного клиническими сертифицированными методами (чувствительность 62%, специфичность 97%). Предложенный анализ служит удобным неинвазивным способом преддиагностики дисфункций мочевыводящих путей, в том числе и РМП.

3. Повышенное содержание сурвивина в моче пациентов может служить основанием для стратификации больных в отношении неблагоприятных прогностических факторов: высокая гистологическая стадия, большой размер опухоли, наличие мышечной инвазии. Отсутствие сурвивина в моче может служить благоприятным прогностическим фактором, увеличивающим медианный срок безрецидивной выживаемости.

4. Способ позволяет обнаруживать ранние стадии заболевания (случаи немышечно инвазивного рака мочевого пузыря, НМИРМП) с чувствительностью 52%. Выявление сурвивина одновременно с онкомаркером CYFRA 21-1 в моче больных РМП увеличивает чувствительность выявления НМИРМП до 74% при специфичности анализа 89%.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования – от постановки задач, проведения экспериментов и анализа полученных результатов до подготовки публикаций.

Степень достоверности результатов обеспечивается использованием современных методов исследования и статистического анализа, а также достаточным объёмом экспериментальных данных.

Основные положения и научные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на следующих научных конференциях: XVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспективы Свободный 2021» (Красноярск, 2021); Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 2022 г.); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2024» (Москва, 2024); VI Всероссийская конференция «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» (с.Майма, 2024); Конкурс-конференция молодых учёных и специалистов ИБФ СО РАН (Красноярск, 2026).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. Результаты исследований Панамарева Никиты Сергеевича опубликованы в 5 работах по теме диссертации (среди которых 1 статья в списке рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК, и 4 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах), а также в 4 тезисах конференций, оформлен 1 патент РФ.

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Слепов Е.В., Башмакова Е.Е., **Панамарев Н.С.**, Франк Л.А., Зуков Р.А. Белок сурвивин как перспективный маркер диагностики и лечения злокачественных новообразований // Эффективная фармакотерапия. – 2021. – Т17, №2. – С. 58-63. (**УБС 3**)

Публикации в международных базах данных и системы цитирования Web of Science и Scopus:

1. Bashmakova E.E., **Panamarev N.S.**, Kudryavtsev A.N., Frank L.A. N-extended photoprotein obelin to competitively detect small protein tumor markers // Biochemical and biophysical research communications. – 2022. – Vol. 598. – P. 69–73. (**Scopus Q1, УБС 1**)
2. **Панамарев Н.С.**, Башмакова Е.Е., Кудрявцев А.Н., Черняев Д.В., Мазаев А.В., Слепов Е.В., Зуков Р.А., Франк Л.А. О диагностической и предикторной значимости онкомаркера сурвивина (BIRC5) при раке мочевого пузыря // Вопросы онкологии. – 2023. – Т.69, №2. – С. 308-315 (**Scopus Q4, УБС 1**)

3. **Panamarev N.S.**, Matveev A.L., Chernyaev D.V., Zukov R.A., Frank L.A. Urine survivin (BIRC5) bioluminescence-based immunoassay // Analytical Methods. – 2025. – Vol.17, №23. – P. 4718–4722. (**Scopus Q2, УБС 1**)
4. **Панамарев Н.С.**, Черняев Д.В., Слепов Е.В., Зуков Р.А., Франк Л.А. Диагностика и мониторинг течения рака мочевого пузыря на основе биолуминесцентного иммуноанализа сурвивина (BIRC5) в моче // Вопросы онкологии. – 2026. – Т.72, №2. – С.319-327. (**Scopus Q4, УБС 1**)

Прочие публикации:

1. **Панамарев Н.С.**, Башмакова Е.Е, Франк Л.А. Способ выявления онкомаркера сурвивина биолуминесцентным микроанализом // Проспект Свободный 2021: материалы XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Красноярск, 19-24 апреля 2021 г.). – Красноярск: Сибирский федеральный университет. – 2021. – С. 1483-1485.
2. **Панамарев Н.С.**, Башмакова Е.Е, Франк Л.А. Иммуноанализ онкомаркера сурвивина в образцах мочи при раке мочевого пузыря // Материалы всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 24-28 июля 2022 г.). – Новосибирск: ООО «Офсет-ТМ». – 2022. – С.215
3. **Панамарев Н.С.** Биолуминесцентный иммуноанализ на основе люциферазы NanoLuc для выявления онкомаркера сурвивина // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2024» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. [Электронный ресурс] – М.: МОО СИПНН Н.Д. Кондратьева. – 2024. – URL: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2024/index.htm
4. **Панамарев Н.С.**, Башмакова Е.Е., Матвеев А.Л., Франк Л.А. Сурвивин (BIRC5) как биомаркер для диагностики рака мочевого пузыря (РМП): исследования на основе биолуминесцентных технологий // Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты: материалы VI Всероссийской конференции (с. Майма, 29 июля – 1 августа 2024 г.). – Москва: Блок-Принт. – 2024. – С.132-136.

Патент РФ на изобретение:

Патент № 2770490 Российская Федерация, МПК C12N 15/25, C12N 15/70 (2006.01). Рекомбинантная плазмидная ДНК pET19b-Surv-OL, обеспечивающая синтез гибридного белка сурвивин-обелин (Surv-OL) и гибридный белок, связываемый анти-сурвивин антителами и обладающий биолуминесцентной активностью: № 2021120739: заявл. 14.07.2021: опубл. 18.04.2022 / Е. Е. Башмакова, Н. С. Панамарев, Л. А. Франк; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный исследовательский центр "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук". – 4 с.

Соответствие диссертации паспорту специальности 1.5.6 Биотехнология:

Диссертационная работа Панамарева Никиты Сергеевича соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология в соответствии с п.7: Прикладная энзимология, включая ферментные системы, технологии очистки белков, прикладные аспекты белковой инженерии; и п. 22: Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные (включая нанобиосенсорные) технологии. Создание биоаналитических систем для медицинской диагностики и медицинского анализа. Диагностические средства (биочипы, биосенсоры), биосовместимых материалов с применением клеточных, геномных и постгеномных технологий; создание банков биологических образцов.

Заключение: Диссертация Панамарева Никиты Сергеевича «Биолуминесцентный иммуноанализ белка сурвивина в моче при диагностике рака мочевого пузыря» рекомендуется

к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 Биотехнология.

Заключение принято 26.05.2026 на заседании биолюминесцентного семинара № 56 ИБФ СО РАН.

Присутствовало на заседании 20 чел., из них с правом решающего голоса – 13 чел.
Результаты голосования: «за» – 20 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел.



Председатель биолюминесцентного семинара,
Бондарь Владимир Станиславович
доктор биологических наук,
гл.н.с. лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции,
ИБФ СО РАН



Секретарь биолюминесцентного семинара
Посохина Екатерина Дмитриевна
м.н.с. лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции,
ИБФ СО РАН