

## О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию Акентьевой Натальи Павловны **«RНАММ-таргет пептиды: идентификация, влияние на жизнеспособность, апоптоз и инвазивность опухолевых клеток»**, представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

### **Актуальность темы исследования**

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении онкологических заболеваний, одной из нерешенных проблем остается низкая селективность противоопухолевой терапии. Действие идеального лекарственного средства должно быть направлено на элиминацию только злокачественных клеток. Однако традиционная химиотерапия повреждает не только опухолевые, но и нормальные клетки. При этом наиболее чувствительными к повреждающему действию являются высоко пролиферирующие ткани – костный мозг, волосяные фолликулы и эпителий желудочно-кишечного тракта.

В связи с этим одним из многообещающих подходов является таргетная (целевая) терапия. В данном случае препараты блокируют рост и распространение раковых клеток посредством воздействия на специфические молекулы, которые участвуют в росте и развитии опухолевой клетки. Такой подход считается намного эффективнее других способов терапии рака, включая химиотерапию и лучевую терапию.

В настоящее время доказано, что важную роль в возникновении и развитии рака играет микроокружение опухолевой клетки, а именно, внеклеточный матрикс, основным компонентом которого является гиалуроновая кислота. Обнаружено, что трансформированные клетки продуцируют повышенный уровень эндогенной гиалуроновой кислоты, которая при взаимодействии с RНАММ рецептором запускает сигнальные

пути, активирующие пролиферацию опухолевых клеток. Повышенную экспрессию данного рецептора связывают с неблагоприятным прогнозом при различных видах рака. Следовательно, пептиды-лиганды, модулирующие активность RHAMM рецептора, могут оказывать противоопухолевое действие при лечении онкологических заболеваний. Однако данный способ воздействия на RHAMM рецептор остается до сих пор не достаточно изученным. Таким образом, тема диссертационной работы Н.П. Акентьевой, посвященная поиску пептидов, специфически блокирующих RHAMM-зависимый механизм активации опухолевых клеток является, несомненно, актуальной.

### **Научная новизна полученных результатов**

Исследования Н.П. Акентьевой развивались в нескольких основных направлениях:

- Дизайн и синтез пептидов, специфичных к RHAMM рецептору.
- Изучение связывания синтезированных пептидов с CD44 и рекомбинантным RHAMM рецептором.
- Анализ связывания пептидов с опухолевыми клетками.
- Изучение влияния пептидов на пролиферацию, апоптоз и инвазивность опухолевых клеток *in vitro*.
- Изучение влияния пептидов на рост опухолевых клеток предстательной железы человека на мышинной модели опухолевого роста.

В результате проведенных исследований автором получены новые данные о структуре и регуляторных свойствах пептидов, специфически взаимодействующих с RHAMM рецептором. Из них наиболее важными и принципиальными являются следующие:

- Предложена оригинальная система дизайна пептидов-миметиков гиалуроновой кислоты из аминокислотных последовательностей  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина.

- Впервые синтезированы пептиды, эффективно замещающие гиалуроновую кислоту (ГК) в ГК-связывающем центре RHAMM рецептора.
- Выявлен фрагмент с общей аминокислотной последовательностью в структуре синтезированных пептидов, который необходим для их связывания с RHAMM рецептором.
- Впервые показано, что пептиды, взаимодействующие с RHAMM рецептором, индуцируют апоптоз, ингибируют пролиферативную и инвазивную активность опухолевых клеток.
- В экспериментальных исследованиях на ксеногенной модели рака предстательной железы человека показана противоопухолевая активность RHAMM-таргет пептидов.
- Полученные результаты свидетельствуют о том, что синтезированные пептиды обладают выраженным терапевтическим потенциалом и могут применяться как для выявления, так и для элиминации опухолевых клеток.

### **Теоретическая и практическая ценность работы**

Полученные в данной работе результаты, являются значимыми для фундаментальной науки, поскольку углубляют существующие представления о регуляторной роли RHAMM рецептора. Автором убедительно показано, что связывание специфических пептидов с данным рецептором приводит к изменению таких процессов как пролиферация, апоптоз и инвазивность опухолевых клеток. Особый интерес представляют факты, свидетельствующие о взаимосвязи между структурой пептидов и их способностью связываться с RHAMM рецептором, выявлена роль ключевых аминокислот в пептид-белковых взаимодействиях. Предложенные в диссертации методы идентификации RHAMM-таргет пептидов и способы анализа их связывания с рецептором могут быть использованы для исследования функций других рецепторов и их пептидов-лигандов.

Обнаруженная противоопухолевая активность синтезированных пептидов свидетельствует о перспективности их использования для диагностики и лечения злокачественных новообразований. Учитывая, что RНАММ является многофункциональным рецептором, участвующим в регуляции таких процессов как воспаление и фиброзирование поврежденных тканей, полученные пептиды могут найти применение не только в области онкологии, но и при лечении других заболеваний.

### **Обоснованность и достоверность результатов и выводов диссертации**

Все научные положения и практические рекомендации, представленные в диссертации, аргументированы и обоснованы. Достоверность исследования, объективность полученных результатов и выводов диссертации обусловлены достаточным фактическим материалом, полученным с использованием современных биохимических, генно-инженерных и иммуногистохимических методов.

### **Общая характеристика работы**

Диссертация написана в традиционном стиле и включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Методы исследования», «Результаты исследований», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы», включающий 639 источников. Содержание диссертации изложено на 209 страницах, включая 10 таблиц и 74 рисунка.

Во введении автор раскрывает актуальность научной проблемы, анализирует степень разработанности темы, формулирует цель и задачи исследования, обосновывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы. Положения, выносимые на защиту, соответствуют основным результатам исследования.

Обзор литературы написан хорошим языком с привлечением современных литературных источников. Представлен подробный анализ

роли пептидов в диагностике и терапии онкологических заболеваний. Особое внимание уделено анализу использования опухоль-таргетных пептидов. На основании литературных фактов о роли RRAM рецептора в активации внутриклеточных сигнальных путей и пролиферации опухолевых клеток автором предложена научная концепция, согласно которой синтетические пептиды, специфически взаимодействующие с данным рецептором могут изменять активность данного рецептора и обладать терапевтическим потенциалом для лечения онкологических заболеваний. В целом, использование в данной главе достаточно большого количества литературных источников свидетельствует о глубоком анализе изучаемой проблемы.

В главе «Методы исследования» подробно изложены используемые методы и экспериментальные модели. Пептиды синтезировали методом стандартного твердофазного пептидного синтеза. Для их очистки использовали препаративную высокоэффективную жидкостную хроматографию. Идентификация полученных пептидов проводилась с помощью масс-спектрометрического анализа. Для изучения специфичности связывания пептидов с RRAM рецептором использовали собственный рекомбинантный белок RRAM-СТ, полученный методами генной инженерии.

Противоопухолевую активность полученных пептидов изучали на моделях *in vivo* и *in vitro* на трансформированных линиях клеток человека, имеющих повышенную экспрессию RRAM. В качестве контроля в экспериментах использовали нормальные клетки фибробластов. Кроме того, для подтверждения участия RRAM в механизме действия пептидов использовали клеточные линии с нокаутом гена рецептора RRAM(-/-) или трансфицированные с RRAM(+/+). Для анализа связывания флуоресцентно-меченых пептидов с клетками использовали конфокальную микроскопию.

Главы «Результаты исследования» и «Обсуждение результатов» содержат изложение и анализ полученных фактов, касающихся синтеза, очистки и идентификации пептидов, взаимодействующих с RHAMM рецептором. На большом экспериментальном материале автором показано, что пептиды специфично связываются как с рекомбинантным RHAMM-СТ, так и с RHAMM рецептором на поверхности опухолевых клеток. Терапевтический потенциал RHAMM-таргет пептидов продемонстрирован на различных типах клеточных культур. Для доказательства противоопухолевой активности синтезированных пептидов представлены результаты исследования их влияния на жизнеспособность, апоптоз, некроз и инвазивность клеток рака молочной железы и предстательной железы.

Анализ полученных результатов позволил автору сделать заключение, что синтезированные RHAMM-таргет пептиды обладают цитотоксическим, апоптотическим и анти-метастатическим действием на опухолевые клетки. Эти результаты служат основанием для разработки нового подхода - таргетной терапии в лечении онкологических заболеваний.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Н.П. Акентьевой нет. Однако при чтении диссертации возникли следующие вопросы:

1. В диссертации многофункциональный рецептор RHAMM Вы называете онкорепцептором (стр.152). Какие, по Вашему мнению, основные признаки (свойства) онкорепцепторов? Насколько этот термин является общепринятым?
2. В диссертации показано, что эффекты RHAMM-таргет пептидов на апоптоз и некроз являются специфичными для опухолевых клеток (клетки рака молочной железы) и не проявляются в нормальных клетках (эмбриональные фибробласты мыши) (вывод №7). С чем связаны эти различия? Согласно литературным данным RHAMM

экспрессируется во многих типах клеток, в том числе и в нормальных фибробластах.

3. Какой предполагаемый механизм противоопухолевого действия исследуемых пептидов? Почему специфические лиганды RНАММ – синтезированные пептиды (вывод №2) и гиалуроновая кислота, оказывают различные (противоположные) регуляторные эффекты на клетки?

В целом следует отметить большой объем проведенных исследований, в результате чего был получен ценный фактический материал. Работа выполнена на высоком методическом уровне. Полученные результаты являются новыми, приоритетными и полностью обосновывают выводы диссертации. Степень достоверности результатов исследований подтверждена проведенной статистической обработкой.

Автореферат отражает содержание диссертации. По материалам диссертации опубликовано 30 печатных работ, из них 15 статей в высокорейтинговых международных и отечественных изданиях, цитируемых в Web of Science, Scopus и рекомендованных ВАК РФ. Кроме того, результаты работы неоднократно докладывались на отечественных и международных конференциях и симпозиумах.

### **Заключение**

Таким образом, диссертация Акентьевой Натальи Павловны «RНАММ-таргет пептиды: идентификация, влияние на жизнеспособность, апоптоз и инвазивность опухолевых клеток», является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований получен важный фактический материал и разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое достижение в развитии перспективного научного направления, связанного с получением и изучением свойств пептидов для диагностики и лечения

злокачественных новообразований, что имеет важное теоретическое и практическое значение.

По актуальности выбранной темы, объему проведенных исследований, их методическому уровню, научной и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Н.П. Акентьевой соответствует требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», (постановление Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), а также п1 1(а) и п. 1(в) Постановления Правительства Российской Федерации от 20 марта 2021 г. № 426 «О внесении изменений в некоторые акты Правительства Российской Федерации и признании утратившим силу постановления Правительства Российской Федерации от 26 мая 2020 г. № 751», предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

**Официальный оппонент:**

Доктор биологических наук, заведующий лабораторией механизмов межклеточных взаимодействий, директор НИИ биохимии, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (03.00.04 - биохимия)



Усынин И.Ф.

Подпись Усынина И.Ф. заверяю:

Макашова  
отдела кадров



Михеева О.М.

Дата: 12 ноября 2021 г.