



**МИНОБРНАУКИ РОССИИ**  
**Федеральное государственное**  
**бюджетное образовательное**  
**учреждение высшего**  
**образования**  
**«Воронежский государственный**  
**университет»**  
**(ФГБОУ ВО «ВГУ»)**

Университетская пл., 1, Воронеж, 394018.  
Тел. (473) 220-75-21. Факс (473) 220-87-55.  
E-mail: office@main.vsu.ru  
<http://www.vsu.ru>  
ОКПО 02068120, ОГРН 1023601560510  
ИНН/КПП 3666029505/366601001

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор ВГУ

доктор экономических наук, профессор

Д.А. Ендовицкий

2021 г.



19.11.2021 № 0100-251a  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_

### ОТЗЫВ

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

#### 1. Актуальность темы исследования

Одной из наиболее острых проблем биологии и медицины в настоящее время являются онкологические заболевания, частота возникновения которых в мире растет в геометрической прогрессии. Необходимо также отметить высокую стоимость лечения данных заболеваний, а также отсутствие достаточной селективности существующих лекарственных препаратов. Таким образом, актуальными представляются исследования, направленные на разработку таргетной химиотерапии, демонстрирующей максимальный терапевтический эффект и низкую токсичность препарата. Кроме того, в последние годы появляются доказательства онкостатической эффективности биологически активных

пептидов благодаря наличию у них проапоптотического эффекта, способности подавлять пролиферацию и вызывать некроз клеток некоторых видов рака.

RHAMM рецептор, выбранный автором в качестве мишени противоопухолевого воздействия, вызывает интерес с точки зрения диагностики и терапии онкологических заболеваний. Установлено, что RHAMM рецептор синтезируется в избытке в метастатических, агрессивных опухолевых клетках, в том числе в клетках рака молочной и предстательной желез, толстой кишки, в солидных опухолях и в клетках рака крови, при миелоидном лейкозе, множественной миеломе. В связи с этим, идентификация пептидов, специфично связывающихся с RHAMM рецептором и блокирующих его сигнальные пути, является одним из перспективных подходов для диагностики и лечения злокачественных новообразований. Таким образом, настоящее исследование является актуальным и посвящено важной проблеме, связанной с поиском и идентификацией пептидов, способных специфично взаимодействовать с RHAMM рецептором опухолевых клеток, целенаправленно воздействовать на раковые клетки и регулировать ключевые клеточные процессы, такие как пролиферация, жизнеспособность, апоптоз, некроз, инвазивность и метастазирование.

## **2. Новизна исследования и полученных результатов**

Автором предложена новая научная концепция использования RHAMM-таргет пептидов для модуляции RHAMM-рецептора и использования их в качестве тераностиков злокачественных новообразований различной локализации. В ходе исследования была разработана оригинальная система дизайна пептидов-миметиков гиалуроновой кислоты, а также новая методика получения и выделения рекомбинантного RHAMM-СТ белка методом генной инженерии. Впервые были идентифицированы и синтезированы пептиды, представляющие собой фрагменты белка тубулина, специфично взаимодействующие с RHAMM рецептором, разработаны методики для изучения специфичности их связывания.

Научная новизна диссертационной работы состоит также в том, что впервые проведено систематическое исследование RHAMM-таргет пептидов, и убедительно продемонстрировано наличие у них потенциала для ранней молекулярной диагностики злокачественных новообразований. Впервые получены данные, открывающие новые возможности для адресной визуализации опухолевых клеток. Автором найдены пептиды, специфично связывающиеся с RHAMM рецептором на поверхности опухолевых клеток рака молочной, предстательной желез и рака яичников, которые могут использоваться для визуализации. Для данных пептидов была разработана новая научная система использования для клеточной терапии раковых заболеваний с помощью индукции

процессов апоптоза, некроза, подавления жизнеспособности, пролиферации и инвазивности опухолевых клеток. При этом была продемонстрирована высокая специфичная цитотоксическая и противоопухолевая активность RНАММ-таргет пептидов.

Соискателем впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды вызывают морфологические изменения в клетках, нарушают структурную организацию актина и подавляют образование инвадоподий опухолевых клеток молочной и предстательной желез. Впервые показано, RНАММ-таргет пептиды обладают антиметастатическим потенциалом, так как ингибируют инвазивность клеток рака молочной и предстательной желез. Эффективность RНАММ-таргет пептидов была показана как *in vitro*, так и *in vivo*.

Таким образом, в ходе проведенного исследования получены новые данные, представляющие интерес как для молекулярной диагностики, так и клеточной терапии онкологических заболеваний.

### **3. Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Данные, полученные в ходе проведенного исследования, имеют высокую ценность с точки зрения углубления фундаментальных знаний о модуляции активности RНАММ онкорцептора с помощью пептидов, а также о роли RНАММ рецептора в регуляции важных клеточных процессов, таких как жизнеспособность, пролиферация, апоптоз, некроз и инвазивность опухолевых клеток.

Впервые всесторонне, на основании комплексного подхода, изучен диагностический и терапевтический потенциал RНАММ-таргет пептидов для лечения онкологических заболеваний и визуализации опухолевых клеток, что обуславливает высокую научную значимость результатов. Данные результаты служат основанием для разработки нового подхода – таргетной терапии в лечении онкологических заболеваний, с применением RНАММ-таргет пептидов. Использование флуоресцентно-меченых RНАММ-таргет пептидов для визуализации опухолевых клеток будет способствовать созданию молекулярных зондов для ранней неинвазивной диагностики злокачественных новообразований.

Результаты диссертационной работы расширяют возможности для разработки новых таргетных пептидов на основе изучения белок-белковых взаимодействий. Полученные данные будут способствовать разработке вопросов о роли белок-белковых взаимодействий в функционировании биомолекул, что может быть полезным для углубления понимания их пространственно-структурной организации.

Теоретическая значимость исследований заключается в том, что научные положения диссертационной работы значительно расширяют современные воззрения относительно физиологической активности пептидов, механизме их действия и участия в регуляции сигнальных путей.

В ходе выполнения исследования был впервые разработан эффективный метод получения рекомбинантного RНАММ-СТ белка с помощью генной инженерии, позволяющий получить гомогенный белок с высоким выходом. На разработанный метод выделения и очистки был получен международный патент на изобретение.

Разработанные новые методы идентификации RНАММ-таргет пептидов и анализа их специфичности связывания с RНАММ рецептором имеют универсальный характер и могут применяться для исследований других рецепторов и их пептидов-лигандов.

В диссертационной работе представлены практические рекомендации применения RНАММ-таргет пептидов для клеточной терапии рака. Следует отметить, что существенное значение с точки зрения реализации перспектив практического использования RНАММ-таргет пептидов имеют дешевизна их синтеза и специфичность действия. Полученные в этом плане данные могут служить основанием для дальнейших разработок и проведения доклинических испытаний эффективности RНАММ-таргет пептидов.

В целом, результаты, полученные диссертантом, вносят значительный вклад в современные представления относительно диагностического и терапевтического потенциала RНАММ-таргет пептидов для лечения онкологических заболеваний.

#### **4. Структура и содержание диссертации**

Структура представленной диссертационной работы стандартна и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы (639 источников). Иллюстративный материал включает 74 рисунка и 10 таблиц.

Во введении приводится аргументация актуальности проблемы, автор уделяет внимание также теоретической и практической значимости проведенной работы. Цель и задачи работы, а также положения, выносимые на защиту, четко сформулированы.

В диссертационной работе представлен достаточно обстоятельный литературный обзор, полно освещающий вопросы, касающиеся тематики проведенного исследования. В нем подробно рассмотрены следующие аспекты: пептиды в диагностике и терапии онкологических заболеваний, характеристика системы RНАММ/гиалуроновая кислота,

возможности использования гиалуроновой кислоты и RHAMM рецепторов в качестве мишеней для терапии онкологических заболеваний. Подробно освещены особенности физиолого-биохимического действия различных биологически активных пептидов, сигнальные пути, находящиеся под регуляцией RHAMM рецепторов и гиалуроновой кислоты, современные возможности таргетной терапии раковых заболеваний.

Экспериментальная часть работы производит положительное впечатление, содержит адекватные поставленным задачам современные биохимические, физико-химические и молекулярно-биологические подходы, методы биоинформатики, синтеза и очистки пептидов, генной инженерии. В работе сочетается анализ влияния RHAMM-таргет пептидов на выживаемость, инвазивность и рост опухолей с помощью экспериментов *in vitro* и *in vivo*. Достаточно подробное изложение используемых в работе методик позволяет легко их воспроизвести. Использование в экспериментах лабораторных животных осуществлялось в соответствии с принципами гуманности и требованиями международных правил гуманного отношения к животным (УК РФ ст. 245). Автором была проведена необходимая статистическая обработка данных.

В главах 3 и 4 автор описывает результаты диссертационных исследований и проводит их обсуждение. Диссертация написана грамотным языком, читается легко и с большим интересом, аргументы четкие, убедительные. Иллюстрации и таблицы полностью соответствуют содержанию.

В ходе работы были впервые идентифицированы и синтезированы RHAMM-таргет пептиды, представляющие собой аминокислотные последовательности  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц белка тубулина, а также выбраны несколько наиболее перспективных кандидатов из данных соединений для дальнейших исследований. Проанализированы взаимосвязи между сродством синтезированных пептидов к RHAMM, составом пептидов и химическими взаимодействиями, обеспечивающими связывание исследуемых лигандов с рецептором. Результаты исследования показали, что пептиды конкурентно и эффективно замещали гиалуроновую кислоту на ГК-связывающем центре белка RHAMM-СТ, были достаточно стабильны в сыворотке крови и показали приемлемое время полураспада. Кроме того, результаты работы свидетельствуют о том, что RHAMM-таргет пептиды представляют интерес с точки зрения специфичной визуализации опухолевых клеток с целью ранней диагностики онкологических заболеваний. Автором впервые был исследован терапевтический потенциал RHAMM-таргет пептидов, в частности, их воздействие на жизнеспособность клеток рака молочной и предстательной желез. Показано, что RHAMM-таргет пептиды действуют адресно на опухолевые клетки и их эффект является RHAMM-опосредованным. Кроме этого, полученные результаты свидетельствуют, что RHAMM-

таргет пептиды обладают антиметастатическим потенциалом. В ходе работы по изучению терапевтического потенциала RНАММ-таргет пептидов было показано, что синтезированные пептиды эффективно подавляют рост опухолей.

По итогам проведенных исследований и анализа результатов автором сформулированы 12 выводов. Выводы достоверные и последовательно вытекают из сущности работы. Положения, выносимые на защиту, логичны и отражают выявленные в ходе исследования закономерности. Приведенные автором выводы и положения позволяют сделать заключение, что цель, поставленная в диссертационной работе, достигнута. Диссертация является самостоятельным научным трудом и имеет законченный характер.

### **5. Рекомендации по использованию результатов диссертации**

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертации, могут быть полезны для ученых, занимающихся исследованиями в области биохимии, биотехнологии, в особенности, осуществляющими разработки по созданию лекарственных препаратов.

Хотелось бы подчеркнуть значимость результатов, нашедших отражение в рекомендациях практического применения RНАММ-таргет пептидов для клеточной терапии рака посредством индукции апоптоза, некроза, подавления роста и инвазивности опухолевых клеток, что служит основой создания кандидатов лекарственных препаратов.

Полученные диссертантом результаты могут быть использованы при проведении научно-исследовательской работы и в учебном процессе при чтении лекций по общим курсам «Биохимия», «Молекулярная биология», а также спецкурсов биомедицинской направленности в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Российском национальном исследовательском медицинском университете им. Н.И. Пирогова, Воронежском государственном университете, Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук и ряде других учебных и научных центров России.

### **6. Степень обоснованности и достоверность научных положений и выводов**

В целом диссертационная работа оставляет хорошее впечатление. Научная значимость, достоверность и обоснованность результатов, представленных диссертантом, не вызывают сомнения.

Достоверность научных результатов диссертационной работы, правильность выводов и положений, выносимых на защиту, подтверждены их широкой апробацией. Основные результаты работы доложены на международных научно-практических конференциях и форумах.

Научная обоснованность результатов диссертационного исследования аргументирована большим количеством фактического материала. Новизна не только данных, полученных в результате проведенных исследований, но и новизна ряда подходов автора не вызывает сомнения.

Автор воспользовался современными методами исследования, адекватными поставленным задачам. В работе использовались корректные способы статистической обработки, обеспечивающие полноценность сделанных выводов.

Практические рекомендации являются закономерными. Основные положения диссертационной работы научно обоснованы, сделаны на основании глубокого анализа большого объема фактического материала.

### **7. Замечания и комментарии к работе**

В целом диссертация оставляет положительное впечатление. Принципиальных замечаний к работе Акентьевой Н.П. нет. Вместе с тем, на наш взгляд, интересная экспериментальная работа, выполненная диссертантом, вынуждает поставить перед автором ряд вопросов, которые, несомненно, носят полемический характер и подчеркивают актуальность выполненной диссертации.

В частности:

- 1) Автором выявлены различия в эффекте RНАММ-таргет пептидов на степень апоптоза и некроза раковых клеток предстательной и молочной железы. Для анализа и оценки результатов, как нам кажется, было бы полезным полностью привести методику определения степени апоптоза и некроза в клетках (П.2.10, стр. 75).
- 2) По нашему мнению, было бы уместно подробнее остановиться на различиях в биохимических свойствах используемых клеточных линий опухолей предстательной железы и молочной железы. Это могло бы дать дополнительную информацию о механизме противоопухолевого действия пептидов (Цитата стр.158 «Следует отметить, что опухолевые клетки предстательной железы оказались более чувствительными к воздействию пептидов, чем клетки рака молочной железы. Вероятно, это объясняется различными биохимическими свойствами этих клеточных линий [1].»).
- 3) В работе ничего не сказано о конформации полученных синтетических пептидов. Были ли попытки ее оценить? Нет ли вероятности, что эти пептиды будут образовывать амилоидные структуры?
- 4) У нас есть сомнения, правильно ли называть уменьшение под действием RНАММ-таргет пептидов образования гигантских клеток старения в популяции опухолевых клеток

«сенолитическим потенциалом» (напр., стр.164), так как речь идет не о разрушении уже имеющихся клеток старения. Хотя не исключено, что этот процесс – разрушения гигантских клеток старения – также индуцируют исследуемые пептиды, но в работе это не обсуждается. Кроме того, есть мнение, что эти гигантские клетки в опухолях вовсе не стареющие, а временно перешедшие в неделяющееся состояние клетки, которые таким образом обеспечивают целостность своей ДНК и выживание при различных, например, химиотерапевтических, воздействиях (Pienta K.J., Hammarlund E.U., Brown J.S., Amend S.R., Axelrod R. Cancer recurrence and lethality are enabled by enhanced survival and reversible cell cycle arrest of polyan euploid cells. *M Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Feb 16;118(7):e2020838118. doi: 10.1073/pnas.2020838118).

Сделанные замечания не носят принципиального характера и не умаляют основных достоинств рецензируемой диссертации.

#### **8. Полнота изложения результатов диссертации в научной печати**

Основные результаты диссертационной работы Н.П. Акентьевой достаточно полно отражены в 15 статьях в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в базах Scopus и Web of science, в 1 патенте, а также в материалах конференций различного уровня.

#### **Заключение**

Диссертационная работа Н.П. Акентьевой «RНАММ-таргет пептиды: идентификация, влияние на жизнеспособность, апоптоз и инвазивность опухолевых клеток» представляет собой целостное, законченное, самостоятельное исследование, посвященное решению одной из важных проблем современной биохимии – поиску пептидов, специфично связывающихся с RНАММ рецептором и блокирующих его сигнальные пути, что является одним из перспективных подходов для диагностики и лечения злокачественных новообразований. Работа выполнена на современном научно-методическом уровне.

По актуальности, новизне, научной и практической значимости диссертация Н.П. Акентьевой соответствует специальности 1.5.4. – Биохимия, отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, и автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.



Отзыв обсужден и утвержден на межкафедральной конференции кафедры медицинской биохимии и микробиологии и кафедры биофизики и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», протокол №1 от 17.11.2021 г.

Доктор биологических наук, профессор,  
Декан медико-биологического факультета,  
заведующая кафедрой медицинской биохимии и микробиологии  
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Попова Т.Н.

Подпись Т.Н. Поповой заверяю:



Адрес: Медико-биологический факультет Воронежского государственного университета,  
394018, Россия, г. Воронеж, Университетская пл. 1,  
Тел: +7 473 228 11 60 (1111)  
e-mail: [tpopova@bio.vsu.ru](mailto:tpopova@bio.vsu.ru)