

ОТЗЫВ

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 диссертационного исследования.

Онкологические заболевания остаются одной из ведущих причин смерти в большинстве стран мира. Низкая выявляемость онкологических заболеваний на ранних стадиях и недостаточная эффективность и избирательность существующих методов лечения рака делают крайне актуальной проблему поиска новых, более действенных и высокоспецифичных методов их диагностики и терапии. Эффективность большинства лекарственных препаратов, используемых в настоящее время для лечения рака, ограничена рядом факторов, таких как низкий терапевтический индекс большинства химиотерапевтических агентов, опасность появления лекарственно-устойчивых популяций раковых клеток, гетерогенность опухолей, развитие метастазов. Исследования последних лет убедительно доказали, что опухоли содержат специфическую популяцию клеток, названных опухолевыми стволовыми клетками (ОСК), которые обладают высокой устойчивостью к радио- и химиотерапии. Сохранившаяся небольшая популяция высокорезистентных ОСК впоследствии приводит к рецидиву заболевания.

Прогресс в изучении молекулярных механизмов патогенеза заболеваний и разработка новых методов в области молекулярной биологии и биотехнологии открывают возможности для создания новых лекарств, избирательно модулирующих различные сигнальные пути, характерные для опухолевых клеток. Таким образом, появляется возможность целенаправленного индивидуального лечения на основе уникального комплекса молекулярных мишеней, продуцируемых опухолью пациента.

Применяемые в настоящее время в клинике "таргетные" противоопухолевые препараты представляют собой либо антитела к специфическим детерминантам опухолевых клеток, либо ингибиторы рецепторных тирозинкиназ. Они весьма эффективны, но крайне дорогостоящие. Альтернативным подходом является разработка препаратов на основе биологически активных пептидов, синтез которых является дешевым и экономически эффективным. Примером таких пептидов является октреотид – биологически активный фрагмент соматостатина, на основе которого создан ряд радиофармпрепаратов, успешно применяющихся для диагностики опухолей.

Рецепторы гиалуроновой кислоты (ГК) являются одной из привлекательных мишеней при создании противоопухолевых препаратов направленного действия. Правда,

чаще всего речь идет о CD44. Однако, не менее (а, возможно, и более) интересен другой рецептор ГК, обозначаемый как RHAMM – рецептор гиалуроновой кислоты, опосредующий подвижность. Взаимодействие ГК, компонента внеклеточного матрикса, составляющего микроокружение опухоли, с этим рецептором приводит к активации сигнальных путей, стимулирующих пролиферацию опухолевых клеток. Блокирование RHAMM, возможно, может быть эффективным способом подавления пролиферации и индукции гибели раковых клеток. Таким образом, диссертационное исследование Натальи Павловны Ацентьевой, посвященное поиску специфических пептидов-антагонистов RHAMM, которые можно использовать не только для подавления опухолевого роста, но и для диагностики, безусловно, является актуальным и востребованным.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций,
сформулированных в диссертации, их достоверность.**

Основные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе Ацентьевой Н.П., научно обоснованы, закономерно следуют из результатов, базируются на обширном экспериментальном материале. Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне с использованием современных биохимических, аналитических, генно-инженерных и иммунохимических методов, достоверность результатов благодаря использованному арсеналу методов, соблюдению требований статистики при проведении экспериментов не вызывает сомнений.

**Научная новизна исследования, теоретическая и практическая значимость
полученных результатов.**

Н.П. Ацентьевой предложена концепция использования RHAMM-таргет пептидов для модуляции активности RHAMM-рецептора и применения RHAMM-таргет пептидов в качестве тераностиков злокачественных новообразований различной локализации. Разработана оригинальная система дизайна пептидов-миметиков гиалуроновой кислоты из аминокислотных последовательностей α - и β -тубулина. Впервые идентифицированы и синтезированы пептиды, представляющие собой фрагменты белка тубулина, специфично связывающиеся с RHAMM рецептором. Разработана новая, эффективная экспериментальная методика получения и выделения рекомбинантного RHAMM-СТ белка, позволяющая получить с высоким выходом гомогенный белок, обладающий биологической активностью. Разработана методика для изучения специфичности связывания RHAMM-таргет пептидов с рекомбинантным RHAMM-СТ. Впервые выявлена закономерность между наличием общего фрагмента EEXEEZ в структуре RHAMM-таргет пептидах с их специфичностью и высоким сродством связывания с RHAMM-СТ.

Исследована связь между структурой, размером RНАММ-таргет пептидов и их физиологической активностью в клетках. Доказана закономерность соответствия структуры и функции RНАММ-таргет пептидов. Впервые показано, что пептиды специфично связываются с RНАММ рецептором на поверхности опухолевых клеток рака молочной, предстательной желез и рака яичников. Продемонстрировано, что RНАММ-таргет пептиды могут использоваться для визуализации опухолевых клеток. Впервые продемонстрирована высокая специфичная цитотоксическая и противоопухолевая активность RНАММ-таргет пептидов *in vitro* и *in vivo*. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды индуцируют апоптоз и некроз в клетках опухолевых линий аденокарцином молочной и предстательной желез. Обнаружено, что RНАММ-таргет пептиды вызывают морфологические изменения в клетках, нарушают структурную организацию актина и подавляют образование инвадоподий опухолевых клеток. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды обладают антиметастатическим и сенолитическим потенциалом. Показано, что RНАММ-таргет пептиды проявляют противоопухолевую активность *in vivo*.

Полученные Н.П. Акентьевой результаты, безусловно, имеют не только теоретическую, но и практическую значимость. На основе RНАММ-таргет пептидов вполне реально разработать новые средства для диагностики и лечения некоторых наиболее распространенных опухолей.

Полнота изложения основных результатов диссертации в рецензируемых научных изданиях.

Основные результаты диссертации отражены в 30 публикациях в журналах и сборниках конференций, из них 15 статей в рецензируемых научных журналах, включенных в Перечень ВАК РФ, и в международных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Н.П. Акентьева является автором патента, оформленного с использованием результатов диссертационного исследования.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа Н.П. Акентьевой построена по классическому принципу и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, описание результатов исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 639 источников. Диссертация изложена на 209 страницах печатного текста, иллюстрирована 74 рисунками и содержит 10 таблиц.

Введение посвящено обоснованию актуальности исследования, изложены цель и задачи работы, новизна, теоретическая и практическая значимость. Задачи соответствуют поставленной цели, положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно.

Обзор литературы представлен тремя разделами. В первом разделе автор дает характеристику разным типам биологически активных пептидов, рассматривает механизмы их взаимодействия с клетками, оценивается возможность использования некоторых пептидов для непосредственного ингибирования пролиферации опухолевых клеток и для направленной доставки лекарственных препаратов, белков, нуклеиновых кислот в клетки-мишени или в определенные компартменты клетки. Во втором разделе Н.П. Акентьева дает общую характеристику системы RНАММ/ГК, детально анализирует роль ГК в физиологии клетки и канцерогенезе. В этом же разделе автор дает подробную характеристику RНАММ, уделяя особое внимание внеклеточным и внутриклеточным функциям RНАММ. Третий раздел посвящен исследованию возможности использования ГК и RНАММ в качестве мишеней для терапии онкологических заболеваний.

Обзор литературы охватывает современные сведения по изучаемым вопросам, вводит читателя в круг анализируемых автором проблем. Обзор хорошо написан, четко структурирован, читается с большим интересом.

В главе "Материалы и методы" очень подробно описаны все использованные автором материалы и весь арсенал использованных в работе методов. Все использованные методы полностью адекватны поставленным задачам.

Собственные результаты автора и их обсуждение изложены в соответствующих главах. Н.П. Акентьева синтезировала 20 пептидов-миметиков гиалуриновой кислоты из аминокислотных последовательностей α - и β -тубулина. После исследования связывания пептидов с рекомбинантным RНАММ-СТ с помощью метода плазмонного резонанса были отобраны 3 перспективных пептида. Специфичность связывания была экспериментально доказана несколькими методами. K_d для пептидов составляла $2-3 \times 10^{-8}$. Показано, что RНАММ-таргет пептиды связываются с ГК-связывающим сайтом RНАММ. С помощью аланинового сканирования выявлена взаимосвязь между структурой пептидов и их способностью связываться с RНАММ рецептором. Доказана роль ключевых аминокислот E, G и Y в связывании с RНАММ.

Автором убедительно доказано не только специфическое связывание флуоресцентно-меченных пептидов с клетками опухолевых линий человека, но и продемонстрировано, что RНАММ-таргет пептиды обладают цитостатической, апоптотической и антиметастатической активностью. При этом RНАММ-таргет пептиды не влияют на жизнеспособность нормальных контрольных клеток.

В ходе исследования влияния RНАММ-таргет пептидов на инвазивность клеток линии MDA-MB-231, Н.П. Акентьева обнаружила, что популяция клеток неоднородна: наряду с высоко инвазивными мелкими клетками в культуре присутствовало заметное количество крупных, многоядерных, неинвазивных клеток, которые были определены автором как сенильные или стареющие клетки. Было обнаружено, что RНАММ-таргет пептиды индуцировали стресс актиновых волокон в этих клетках, подавляли формирование инвадоподий и вызывали гибель этих клеток, то есть RНАММ-таргет пептиды дополнительно обладают еще и сенолитическим потенциалом.

Противоопухолевая активность RНАММ-таргет пептидов была подтверждена в экспериментах *in vivo* на ксенографтной модели рака предстательной железы человека (PC3m-LN4), привитой иммунодефицитным мышам.

Глава 4 представляет собой развернутое обсуждение результатов диссертационного исследования. Автор анализирует и обобщает полученные результаты, приводит дополнительные аргументы в пользу возможного практического применения RНАММ-таргет пептидов для диагностики и лечения злокачественных новообразований.

В "Заключении" автор подводит итоги исследования, обобщая полученные результаты. Все 12 выводов диссертационной работы логично вытекают из полученных данных, адекватны и полностью обоснованы.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, предъявляемыми к авторефератам, дает полное представление об основных положениях диссертации и соответствует ее содержанию.

Замечания по содержанию и оформлению диссертационной работы.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Н.П. Акентьевой нет.

Вопросы и замечания не принципиального характера:

1. Почему при исследовании связывания флуоресцентно-меченных пептидов с рекомбинантным RНАММ-СТ использовали достаточно высокие концентрации пептидов – 25 и 50 мкМ (рис. 23 в диссертации, рис. 4 в автореферате)? Ведь рассчитанные значения K_d составляли 20-30 нМ.
2. В таблице 10 не приведены разбросы (стандартное отклонение).
3. В разделе 2.7 при описании методики, по которой определяли связывание пептидов опухолевыми клетками указано, что клетки "сеяли на покровные стекла... в культуральные планшеты... К клеткам в лунки добавляли ростовую среду (DMEM +

0,1% FBS) и проводили стадию «голодания» клеток в течение ночи при 37°C. После этого, клетки стимулировали с DMEM + 10% FBS и растили в течение ночи в CO₂-инкубаторе при 37°C. На следующий день ростовую среду удаляли из лунок и клетки промывали с ростовой средой DMEM + 0,1% FBS". Зачем это делали? Дальше тоже не совсем понятно: "чтобы блокировать неспецифичное связывание, к клеткам добавляли раствор 3% БСА в среде DMEM + 0,1% FBS и инкубировали в течение 1 час при комнатной температуре. После этого к клеткам добавляли антитела... в растворе DMEM + 0,1% FBS и инкубировали при 37°C в течение 1 часа в CO₂-инкубаторе. Затем ростовую среду удаляли, а клетки опять промывали раствором DMEM + 0,1% FBS. После промывки к клеткам добавляли FITC-пептиды". Для чего нужны такие сложности?

4. Перевод термина "senescence cells" как "клетки старения" крайне неудачен. "Senescence cells" – это сенильные клетки или стареющие клетки. В культуре всегда имеется некоторое количество таких клеток. Есть классические методы для их идентификации, наиболее распространенный – окрашивание на бета-галактозидазную активность.
5. В культуре клеток линии MDA-MB-231 было обнаружено 2 популяции клеток: крупные "стареющие" и мелкие инвазивные. Не могут ли мелкие клетки быть ОСК (в этой линии обычно регистрируется высокий процент CD44⁺/CD24^{-low} клеток)?

Следует подчеркнуть, что замечания носят лишь частный характер и ни в коем случае не снижают ценность полученных результатов и не ставят под сомнение научную значимость исследования.

Заключение

Диссертационная работа Акентьевой Натальи Павловны на тему: "RНАММ-таргет пептиды: идентификация, влияние на жизнеспособность, апоптоз и инвазивность опухолевых клеток", представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия, является самостоятельной цельной законченной, научно-квалификационной работой, результаты и выводы которой вносят существенный вклад в развитие современной биохимии и химии пептидов. На основании выполненных автором исследований получены уникальные результаты, предложено новое направление в диагностике и терапии онкологических заболеваний, связанное с использованием пептидов-антагонистов специфических рецепторов опухолевых клеток. По актуальности выбранной темы, научной новизне, содержанию, объему проведенных исследований, их

методическому уровню, степени обоснованности научных положений и выводов, научной и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Н.П. Аментьевой соответствует требованиям пп. 9-11, 13, 14 "Положения о присуждении ученых степеней", (постановление Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), а также п 1 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,
ведущий научный сотрудник лаборатории
клеточной биологии и молекулярной медицины
ФГБУ «Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт»
(03.01.04– биохимия)

Посыпанова Г.А.

123182, Российская Федерация, г. Москва,
площадь Академика Курчатова, 1.
Телефон: +7(499)196-7100, доб. 6683
Электронная почта: galinapo@gmail.com

Подпись Посыпановой Галины Ароновны заверяю:

Главный ученый секретарь
«Курчатовский институт»



И.И. Еремин

03 декабря 2021 г.