

**Отзыв**  
**официального оппонента**  
**доктора биологических наук, профессора**  
**Зинченко Валерия Петровича, на диссертацию**  
**Акентьевой Натальи Павловны на тему: «RHAMM-таргет пептиды:**  
**идентификация, влияние на жизнеспособность, апоптоз и**  
**инвазивность опухолевых клеток», представленную к защите на**  
**соискание учёной степени доктора биологических наук по**  
**специальности 1.5.4 – биохимия.**

**Актуальность темы исследования**

Одной из нерешенных проблем онкотерапии остается низкая селективность противоопухолевых препаратов. Для визуализации опухоли и селективной доставки препаратов в последние годы активно развивается целенаправленная терапия, использующая различные особенности молекулярной структуры раковых клеток. Одним из типов мишеней воздействия являются рецепторы, регулирующие сигнальные пути пролиферации, выживания и апоптоза. К таким рецепторам относится и RHAMM рецептор гиалуроновой кислоты, продуцируемой трансформированными клетками. RHAMM рецептор относится к онкорепторам и обозначается как CD168. Взаимодействие рецептора с клетками довольно сложное и включает участие других рецепторов. Предполагается, что антагонисты этого рецептора будут оказывать обратный эффект: подавлять пролиферацию, ингибировать пути выживания и активировать апоптоз клеток. Поиску таких соединений и посвященная диссертационная работа Н.П. Акентьевой. В связи с ростом онкологических заболеваний настоящее исследование, несомненно, является актуальным и перспективным. При постановке задачи автор убедительно обосновывает необходимость проведения поиска среди эндогенных пептидов белков, связывающихся с рецептором. Поиск антагонистов среди пептидов обусловлен тем, что природные агонисты такого типа рецепторов являются белками или молекулами имеющими большой размер, как гиалуроновая

кислота. Вторая причина, что внутри клеток RНАММ связывается с микротрубочками и играет существенную роль в регуляции митоза. RНАММ появляется на клеточной мембране в ответ на активацию цитокинами, такими, как TGF- $\beta$ . Последующее связывание RНАММ с CD44 и гиалуроновой кислотой активирует сигнальные пути выживания и пролиферации и усиления ангиогенеза. Считается, что использование пептидов, специфично связывающихся с RНАММ рецептором, может быть перспективным подходом не только для лечения, но для диагностики злокачественных новообразований.

При создании и исследовании RНАММ-таргет пептидов автором были решены следующие главные задачи:

1. Идентифицированы и синтезированы пептиды, специфично связывающиеся как с рекомбинантным RНАММ-СТ, так и с RНАММ рецептором раковых клеток молочной и предстательной железы и с клетками рака яичников.
2. Показано влияние RНАММ-таргет пептидов на жизнеспособность, апоптоз, некроз, активность каспаз-3/7, инвазивность опухолевых клеток молочной и предстательной железы.
3. Показана противоопухолевая активность RНАММ-таргет пептидов на животных.
4. Показана возможность использования меченых FITC RНАММ-таргет пептидов для диагностики/визуализации рака яичников.

#### **Достоверность и новизна научных положений и выводов**

Полученные в работе результаты, являются значимыми для фундаментальной науки, поскольку выясняют молекулярные механизмы блокирования RНАММ рецептора и систем передачи сигналов пролиферации и выживания. В работе получено много новых существенных результатов, использованы оригинальные методические подходы и, наконец, предложена научная концепция использования RНАММ-таргет пептидов для диагностики и лечения злокачественных новообразований различной

локализации. В частности, автором представлена оригинальная система отбора и произведен синтез пептидов из аминокислотных последовательностей тубулина, специфично связывающихся с RНАММ рецептором. Разработана новая, методика получения рекомбинантного RНАММ-СТ белка. Впервые выявлена закономерность между наличием общего фрагмента EEXEEZ в структуре RНАММ-таргет пептидов и высоким сродством связывания с RНАММ-СТ. Впервые показана специфичность связывания пептидов с RНАММ рецептором на поверхности опухолевых клеток рака молочной, предстательной желез и рака яичников и продемонстрирована их высокая противоопухолевая активность. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды ингибируют инвазивность клеток рака молочной и предстательной желез. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды могут использоваться для адресной визуализации опухолевых клеток.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость исследования основана на том, что получены новые фундаментальные знания о взаимодействии RНАММ-таргет пептидов с RНАММ рецептором, приведены доказательства о сопряжении RНАММ рецептора с сигнальными путями жизнеспособности, пролиферации, апоптоза и адгезии опухолевых клеток. Полученные результаты имеют перспективу практического применения RНАММ-таргет пептидов для клеточной терапии рака.

Личный вклад соискателя состоит в том, что он принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов на всех этапах исследования.

### **Общая характеристика работы**

Диссертация написана в классическом 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. В обзоре литературы проанализированы основные подходы применения пептидов для диагностики и терапии онкологических заболеваний. Одним из таких подходов является разработка ГК-связывающих пептидов, которые могут специфично блокировать ГК-стимулированную передачу сигналов. Первые попытки в этом направлении привели к созданию пептида PEP-1, были разработаны пептиды, которые имитируют либо сам RНАММ, либо ГК, и было показано, что они влияют на заживление ран, воспалительные и опухолевые процессы. Проанализировав исследования, связанные с разработкой пептидов, связывающихся с RНАММ, автор обосновывает применение таргет-пептидов, выбор рецепторов, способы синтеза и отбора, эффективно подавляющих активность RНАММ рецептора пептидов.

В главе «**Методы исследования**» изложены используемые методы и экспериментальные модели. Для выполнения поставленных задач автор использовал уникальные методики: биоинформационные подходы, компьютерные программы, масс-спектрометрический метод идентификации пептидов, разработал метод получения и очистки рекомбинантного RНАММ-СТ белка, методику анализа конкурентного связывания пептидов с RНАММ-СТ, адаптировал методики, оценивающие влияние пептидов на жизнеспособность, пролиферацию, апоптоз, некроз, инвазивность опухолевых клеток.

### **Результаты**

В первых параграфах главы «результаты» описаны тщательно и последовательно проведенные этапы синтеза, очистки и идентификации пептидов, полученных из карбоксильных концов тубулина, и связывающихся

с RНАММ рецептором. Были синтезированы и охарактеризованы двадцать пептидов. Далее был получен и очищен рекомбинантный белок RНАММ-СТ. С помощью поверхностного плазмонного резонанса было показано высокоаффинное связывание шести пептидов-лигандов с RНАММ-СТ. Для дальнейших экспериментов были выбраны три, наиболее эффективно связывающиеся с рецептором. Анализ связывания показал, что пептиды взаимодействуют с ГК-связывающим центром RНАММ.

В последующих параграфах приведены многочисленные эксперименты по доказательству противоопухолевой активности синтезированных пептидов. Показано, что пептиды специфично связывались с RНАММ на поверхности клеток рака молочной железы, рака яичников, клеток РПЖ и трансфицированных RНАММ<sup>(+/+)</sup> фибробластов. Таким образом, было показано, что RНАММ-таргет пептиды могут быть использованы для визуализации опухолевых клеток при ранней диагностике заболеваний. Далее в работе исследовано влияние отдельных пептидов на выживаемость, пролиферацию, апоптоз/некроз и инвазивность некоторых типов опухолевых клеток. Показано, что пептиды подавляли пролиферацию и вызывали гибель опухолевых клеток MDA-MB-231, молочной и предстательной железы и не оказывали значительного эффекта на гибель нормальных клеток. Показано также, что RНАММ-таргет пептиды ингибируют инвазивность используемых опухолевых клеток. При этом пептиды связываются именно с RНАММ рецептором на поверхности клеток. И, наконец, автором было поставлено несколько успешных экспериментов по подавлению RНАММ-таргет пептидов на рост опухоли *in vivo*.

Таким образом, полученные результаты показали перспективность развития и применения методов подавления и элиминации опухолевых клеток с использованием пептидов подавляющих активность рецепторов, активирующих пролиферацию, выживание и адгезию, и ингибирующих пути программируемой гибели клеток.

Принципиальных замечаний по работе нет. 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 законченной научной работой, в которой на основании выполненных автором исследований, решена проблема, имеющая важное медицинское и социально-экономическое значение. Разработанные теоретические положения можно квалифицировать как новое достижение в развитии перспективного научного направления, связанного с получением и изучением свойств пептидов для диагностики и лечения злокачественных новообразований.

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 п 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, профессор,  
Главный научный сотрудник, и.о. заведующего  
Лабораторией внутриклеточной сигнализации,  
Института биофизики клетки Российской академии  
наук - обособленное подразделение  
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр  
«Пущинский научный центр биологических  
исследований РАН» (03.01.02 - биофизика)  
**Зинченко Валерий Петрович**  
142290 г. Пущино, ул. Институтская, д. 3.  
тел.: 8(916)2354895, e-mail: vpz@mail.ru

Подпись Зинченко В.П. заверяю:

Ученый секретарь ИБК РАН

Шавкунов Константин Сергеевич

22 ноября 2021 г.

