

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Семёновой Галины Владимировны на тему «p21-Активируемые киназы I группы как терапевтические мишени злокачественных опухолей оболочек периферических нервов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология.

### **Актуальность темы выполненной работы**

Молекулярно-прицельная терапия злокачественных новообразований, основанная на инактивации биомолекул регулирующих опухолевый рост, является перспективным направлением современной медицины. Такой подход к лечению злокачественных заболеваний зачастую предлагает пациентам ряд дополнительных терапевтических опций и позволяет добиться высокой эффективности и избирательности действия, минимизируя нежелательные побочные эффекты. На сегодняшний день поиск и валидация мишеней направленной терапии онкологических заболеваний является чрезвычайно актуальной задачей лабораторных и клинических исследований.

Диссертационная работа Семёновой Г.В. посвящена поиску рациональных стратегий молекулярно-прицельной терапии злокачественных опухолей оболочек периферических нервов (MPNST) – тяжёлого онкологического заболевания, не поддающегося лечению традиционными методами. В данной работе в качестве мишеней для терапии этих опухолей были изучены p21-активируемые киназы I группы (PAK1/2/3). Эти протеинкиназы представляют собой узловые сигнальные молекулы, которые участвуют в регуляции клеточной пролиферации, движения клеток и, согласно литературным данным, вовлечены в патогенез некоторых типов опухолей. Так как на сегодняшний день отсутствуют экспериментальные данные о роли этих белков в развитии MPNST, актуальность рецензируемой работы и её научная новизна не вызывает сомнений.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертационная работа Семёновой Г.В. построена по традиционной схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Диссертация изложена на 124 страницах машинописного текста, содержит 33 рисунка и 2 таблицы. В библиографии диссертации представлено 193 источника.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность своего исследования, определяет цель и задачи работы, объясняет, в чём состоит научная новизна и практическая значимость результатов.

Раздел «Обзор литературы» состоит из двух основных частей, первая из которых посвящена p21-активируемым киназам и их роли в развитии онкологических заболеваний, вторая – описанию исследуемых в работе опухолей оболочек периферических нервов.

В первой части обзора автор описывает строение и механизмы активации p21-активируемых киназ, а также их положение в цепи сигнальной трансдукции, излагает данные об участии этих белков в регуляции роста и метастазирования злокачественных опухолей. Отдельной главой представлен сравнительный анализ современных ингибиторов p21-активируемых киназ I группы, включающий данные о строении, механизме действия и субстратной специфичности ингибиторов.

Во второй части обзора литературы представлены данные о молекулярных механизмах возникновения и развития злокачественных опухолей оболочек периферических нервов, а также обсуждение современных подходов к терапии этих опухолей. Особое внимание автор уделяет экспериментальной молекулярно-прицельной терапии MPNST.

В заключительной главе диссертант приводит обзор предварительных данных о возможной роли p21-активируемых киназ в возникновении и развитии опухолей оболочек периферических нервов.

Анализ литературы проведён Семёновой Г.В. на высоком уровне. Изложенный материал достаточно полно отражает современные представления о рассматриваемой проблеме и говорит об актуальности темы исследования. Рассмотрено значительное число публикаций, включая результаты исследований последних лет. Литературный обзор свидетельствует о высокой квалификации диссертанта в области молекулярной биологии и смежных дисциплин и готовит читателя к восприятию полученных результатов.

В разделе «Материалы и методы» представлен научно-методический инструментарий, использованный автором при проведении исследования. Большая часть функциональных экспериментов были выполнены на трёх клеточных линиях MPNST человека и иммортализованных шванновских клетках. Кроме этого, в работе были использованы тканевые микроматрицы опухолей оболочек периферических нервов человека, а также две модельные системы *in vivo*. При выполнении работы применялись современные методы молекулярной и клеточной биологии, соответствующие цели и поставленным задачам. Все материалы и методы, в том числе статистическая обработка данных, описаны подробно и доступно. В целом, данный раздел отражает высокую экспериментальную квалификацию диссертанта.

В разделе «Результаты и обсуждение» описаны и проанализированы полученные в ходе работы собственные результаты экспериментов автора. Раздел хорошо структурирован и разбит на четыре главы. Первая глава посвящена оценке активности PAK1/2/3 в клетках и тканях злокачественных опухолей оболочек периферических нервов. Было продемонстрировано увеличение уровня фосфо-PAK1/2/3 в образцах MPNST по сравнению таковым в тканях доброкачественных опухолей и тканях нормальных нервов человека. Кроме этого, было обнаружено увеличение уровня фосфорилирования PAK1/2/3 в метастазах MPNST.

Вторая и третья главы посвящены изучению влияния ингибиторов PAK1/2/3 и нокдауна *PAK1/2/3* на пролиферативную способность клеток MPNST, их инвазивную способность и внутриклеточную сигнализацию. Автором было показано, что выключение PAK1/2/3 подавляет рост клеток MPNST с высоким исходным уровнем фосфо-PAK1/2/3 и снижает активность узловых компонентов сигнальных каскадов PI3K и Wnt, однако, не приводит к инактивации каскада MEK>ERK.

Четвёртая глава посвящена оценке влияния ингибитора PAK1/2/3 (Frax1036) на рост и распространение злокачественных опухолей оболочек периферических нервов *in vivo* в качестве индивидуального терапевтического агента и в сочетании с ингибитором MEK1/2 (PD-901). Терапия проводилась на модели подкожных ксенографтных опухолей, индуцированных клетками MPNST с высоким и низким уровнем PAK1/2/3, а также на модели экспериментальных лёгочных метастазов MPNST. Было показано, что Frax1036 замедляет рост подкожных MPNST с высоким уровнем фосфо-PAK1/2/3 и не влияет на рост опухолей, индуцированных клетками MPNST с низким уровнем фосфо-PAK1/2/3, однако, подавляет формирование лёгочных метастазов, индуцированных этими клетками. Автором было продемонстрировано, что сочетанная терапия оказывает более выраженный противоопухолевый эффект, чем индивидуальная терапия каждым из ингибиторов во всех использованных мышинных моделях.

Итоги работы суммируются в разделе «Выводы».

### **Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов**

В диссертационной работе Г.В. Семёновой была впервые изучена возможность использования p21-активируемых киназ в качестве мишеней молекулярно-прицельной терапии MPNST. В ходе исследования было обнаружено увеличение уровня фосфо-PAK1/2/3 в тканях опухолей оболочек периферических нервов высокой степени злокачественности. Автором была

впервые установлена взаимосвязь между уровнем фосфорилирования РАК1/2/3 в клетках МРNST и чувствительностью этих клеток к ингибиторам p21-активируемых киназ I группы. Эти данные свидетельствуют о возможности использования фосфо-РАК1/2/3 в качестве потенциального маркера для анализа биопсийного материала с целью прогнозирования течения заболевания, а также предсказания терапевтического ответа МРNST на воздействие ингибиторов РАК1/2/3.

В работе были впервые проведены испытания ингибиторов РАК1/2/3 в клеточных и мышинных моделях МРNST. Было показано, что выключение РАК1/2/3 не влияет на активность киназного каскада MEK>ERK, на основании чего для экспериментальной терапии МРNST было предложено использовать комбинацию ингибитора РАК1/2/3 и ингибитора MEK1/2. Данная комбинация была успешно применена автором в моделях МРNST *in vitro* и *in vivo* и позволила добиться устойчивого противоопухолевого эффекта. Полученные результаты могут служить предпосылкой для создания новых адресных препаратов и могут быть использованы в последующих доклинических испытаниях.

Таким образом, представленное исследование является новым и, несомненно, имеет как практическую (в разработке новых стратегий противоопухолевой терапии), так и теоретическую (в описании новых взаимодействий между сигнальными путями в клетке) значимость.

#### **Достоверность и обоснованность результатов исследования**

Большой объём фактического экспериментального материала, высокий научно-методический уровень исследования и тщательный анализ полученных данных позволяют констатировать об обоснованности полученных данных.

Выводы корректно сформулированы и соответствуют представленному экспериментальному материалу и поставленным задачам. Содержание автореферата отражает основные результаты и выводы диссертационной работы.

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в научных журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. Кроме того, результаты исследований апробированы на 5 международных конференциях.

При знакомстве с представленным материалом возникает ряд вопросов и замечаний

1. В диссертации отсутствует раздел «Заключение», в котором следовало бы более подробно обсудить результаты работы и подвести итоги данного исследования.

2. В работе изучены эффекты одновременной инактивации РАК1, РАК2 и РАК3 в клетках MPNST. Считаете ли Вы, что эти белки могут выполнять индивидуальные функции в развитии исследуемых опухолей?

Заданные вопросы не снижают общую положительную оценку работы, а вызваны интересом к ней. В целом, рецензируемая диссертация не вызывает замечаний

### **Заключение**

На основе всего вышеизложенного можно сделать вывод, что диссертационная работа Семёновой Галины Владимировны «p21-Активируемые киназы I группы как терапевтические мишени злокачественных опухолей оболочек периферических нервов» является законченным исследованием и соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология.

Официальный оппонент

**Елена Валентиновна Казначеева,**

заведующая лабораторией

ионных каналов клеточных мембран

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института цитологии Российской академии наук,

доктор биологических наук (ФГБУН ИНЦ РАН)

194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4

Эл. почта: [evkazn@incras.ru](mailto:evkazn@incras.ru)

Тел. раб.: 8(812)297-1497

Подпись д.б.н. Казначеевой Е.В.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБУН ИНЦ РАН

к.б.н. **Горяева И.И.**

