

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.241.01, СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПИТАНИЯ, BIOTEХНОЛОГИИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 20.12.2021 г. № 9

О присуждении **Акентьевой Наталье Павловне**, гражданке РФ, учёной степени доктора биологических наук.

Диссертация на тему «RНАММ-таргет пептиды: идентификация, влияние на жизнеспособность, апоптоз и инвазивность опухолевых клеток» по специальности 1.5.4-Биохимия принята к защите 16 сентября 2021 г., протокол №8 диссертационным советом 24.1.241.01, созданным на базе ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 109240, г. Москва, Устьинский проезд, 2/14, приказ Минобрнауки России от 11 апреля 2012 №105/нк с учетом изменений от 13.10.2021 г. №1040/нк.

Соискатель Акентьева Наталья Павловна, 1957 года рождения. В 1980 году окончила с отличием биологический факультет Саратовского ордена трудового Красного знамени государственного Университета им. Н.Г. Чернышевского (в настоящее время – федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации) по специальности «Биология» с присвоением квалификации «биолог, преподаватель биологии и химии». В 1980 г соискатель поступила в очную

аспирантуру Института биохимии им. А.Н. Баха Академии наук СССР (в настоящее время – Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»). В 1984 г защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - «биологическая химия» на тему «Функциональные группы активного центра и механизм действия глутаминсинтетаз листьев гороха» в специализированном совете (К 002.96.01) по присуждению ученой степени кандидата наук, созданном на базе Института биохимии им. А.Н. Баха Академии наук СССР (117071, г. Москва, Ленинский проспект 33, корп. 2).

Соискатель работает ведущим научным сотрудником, руководителем подразделения биохимических и клеточных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химической физики Российской академии наук.

Диссертация на соискание ученой степени доктора наук выполнена в Отделе кинетики химических и биологических процессов в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте проблем химической физики Российской академии наук, а также на базе лаборатории исследования рака в Лондонском научном центре (г. Лондон, Онтарио, Канада).

Научный консультант - доктор биологических наук, Топунов Алексей Федорович, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота, Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт биохимии им. А.Н. Баха.

Официальные оппоненты:

Посыпанова Галина Ароновна - доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и молекулярной

медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;

Зинченко Валерий Петрович - доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, и. о. заведующего лабораторией внутриклеточной сигнализации Института биофизики клетки Российской академии наук - обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»;

Усынин Иван Федорович - доктор биологических наук, и. о. директора Научно-исследовательского Института биохимии, заведующий лабораторией механизмов межклеточных взаимодействий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

дали положительные отзывы о диссертации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (г. Воронеж) в своём положительном отзыве, подписанном доктором биологических наук, профессором, деканом медико-биологического факультета, заведующим кафедрой медицинской биохимии и микробиологии Поповой Татьяной Николаевной, указала, что диссертация Акентьевой Натальи Павловны на тему «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 Акентьевой Натальи Павловны на тему «RНАММ-таргет пептиды: идентификация, влияние на жизнеспособность, апоптоз и инвазивность опухолевых клеток» соответствует специальности 1.5.4. «Биохимия», отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства от 24 сентября 2021 г. №842, и автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. «Биохимия».

Соискатель имеет 100 опубликованных работ (52 статьи и 46 тезисов), в том числе по теме диссертации опубликовано 30 работ (общим объемом 28,47 печатных листов), из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 16 работ, в том числе 15 работ в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и образования РФ, среди которых 13 входят в базу Web of Science и 2 – в базу Scopus, а также 1 международный патент, 1 монография и 13 публикаций в докладах российских и международных научных конференций.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Akentieva, N. P. RНАММ-Target Peptides as Molecular Imaging Probes for the Imaging of RНАММ-Expressing Cancer Cells / N. P. Akentieva, A. F. Topunov // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 2–24. Web of Science (Q3, IF=2,04)(2,66 печ. л);
2. Akentieva, N. P. RНАММ-target Peptides Inhibit Proliferation and Viability of Cancer Cells / N. P. Akentieva, A. F. Topunov // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. 12252–12266. Web of Science (Q3, IF=2,04) (1,73 печ. л);
3. Акентьева, Н. П. Визуализация клеток рака яичников пептидом VEGEGEEGEEY / Н. П. Акентьева, С. С. Шушанов // Биологические мем-

- браны.– 2018.– Т. 35, № 2.– С. 131–142. Web of Science (Q4, IF=0, 949) (1, 39 печ. л.);
4. Akentieva, N. RHAMM-target peptides inhibit invasion of breast cancer cells / N. Akentieva // Eurobiotechnology Journal. – 2017. – Vol. 1, №2. – P. 138–148. Web of Science - Emerging Sources Citation Index (Q4). (1, 27 печ. л.);
5. Esguerra, K. V. Identification, design and synthesis of tubulin-derived peptides as novel hyaluronan mimetic ligands for the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM/HMMR) / K. V. Esguerra, C. Tolg, N. Akentieva, M. Price, C. F. Cho, J. D. Lewis, J. B. McCarthy, E. A. Turley, L. G. Luyt // Integrative Biology. – 2015. – Vol. 7, № 12. – P. 1547–1560. Web of Science (Q4, IF=3,475). (3, 00 печ. л.).

На диссертацию и автореферат поступило 7 отзывов от:

1. **Алиева Фазиля**, PhD, доктора философии, ассистент - профессора Университета Содружества Виргинии (г. Ричмонд, США);
2. **Микерова Анатолия Николаевича**, доктора биологических наук, руководителя Саратовского медицинского научного центра гигиены ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровья населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека;
3. **Желева Николая**, PhD, доктора философии, профессора Медицинского Университета Пловдива (г. Пловдив, Болгария);
4. **Шумаева Константина Борисовича**, доктора биологических наук, старшего научного сотрудника ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»;
5. **Евдокимова Юрия Михайловича**, кандидата технических наук, профессора кафедры процессов горения федерального государственного

бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Академия Государственной противопожарной службы Министерства Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий»;

6. **Соловьевой Анны Геннадьевны**, доктора биологических наук, заведующего отделом физико-химических исследований Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации;
7. **Мурзиной Светланы Александровны**, доктора биологических наук, заведующего лабораторией экологической биохимии Института биологии - обособленного подразделения ФГБУН ФИЦ «Карельский научный центр Российской академии наук».

Все отзывы положительные, критических замечаний не содержат.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что они являются ведущими специалистами, имеющими публикации в области биохимии.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана научная концепция использования RНАММ-таргет пептидов (рецептор-гиалуронан опосредованной подвижности таргетные пептиды) для модуляции активности RНАММ-рецептора (рецептор-гиалуронан опосредованной подвижности) и применения RНАММ-таргет пептидов для диагностики и терапии онкологических заболеваний;

впервые предложен оригинальный нетрадиционный подход создания пептидов-миметиков гиалуроновой кислоты из аминокислотных последовательностей α - и β -тубулина. Впервые идентифицированы и синтезированы

пептиды, представляющие собой фрагменты белка тубулина, специфично связывающиеся с RНАММ рецептором;

предложен оригинальный комплексный, биоинформационный подход для сравнительного анализа аминокислотных последовательностей белков, пептидов с целью поиска гомологичных структур. Впервые показана взаимосвязь между наличием общего фрагмента EEXEEZ в структуре RНАММ-таргет пептидов с их специфичностью и высоким сродством связывания с RНАММ-СТ;

впервые разработана и запатентована новая экспериментальная методика выделения и очистки рекомбинантного RНАММ-СТ белка методом генной инженерии, позволяющая получить гомогенный белок с высоким выходом, обладающий биологической активностью;

сформулирована новая научная идея использования RНАММ-таргет пептидов-антагонистов для терапии онкологических заболеваний с помощью индукции процессов апоптоза, некроза, подавления жизнеспособности, пролиферации и инвазивности опухолевых клеток. Впервые продемонстрирована высокая цитотоксическая, апоптотическая, антиметастатическая и противоопухолевая активность RНАММ-таргет пептидов *in vitro* и *in vivo*;

доказана перспективность использования полученных результатов для разработки новых инновационных способов молекулярной диагностики и клеточной терапии раковых заболеваний;

впервые исследована и доказана закономерность соответствия структуры и функции RНАММ-таргет пептидов;

впервые доказано, что RНАММ-таргет пептиды нарушают структурную организацию актина и подавляют образование инвадоподий опухолевых клеток;

впервые изучена гетерогенность популяции раковых клеток методом флуоресцентной конфокальной микроскопии;

предложена научная гипотеза, что RНАММ-таргет пептиды обладают сенолитическим потенциалом, так как уменьшают количество клеток старения;

введен впервые новый термин- RНАММ-таргет пептиды.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

впервые получены новые фундаментальные знания о взаимодействии RНАММ-таргет пептидов с RНАММ рецептором, расширяющие представления о роли RНАММ рецептора в регуляции клеточных процессов, таких как, жизнеспособность, пролиферация, апоптоз, некроз и инвазивность опухолевых клеток;

доказана научная концепция модуляции активности RНАММ рецептора с помощью RНАММ-таргет пептидов. Описаны основные эффекты действия RНАММ-таргет пептидов на раковые клетки, получены новые теоретические знания в области биохимии о физиологической активности RНАММ-таргет пептидов, механизме их действия, регуляции сигнальных путей с помощью пептидов, природных регуляторов клеточного метаболизма;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования (твердофазный синтез пептидов, аффинная хроматография, электрофорез), так и современных биохимических методик (амплификация, трансфекция, Вестерн блоттинг, иммуноферментативный анализ, метод деградации желатина, модели ксенографтов) и физико-химических методов (поверхностный плазмонный резонанс, масс-спектроскопия, конфокальная микроскопия), позволивших получить обладающие новизной результаты;

изложены факты о взаимосвязи структуры RНАММ-таргет пептидов с их функцией в клетке, **доказана роль** ключевых аминокислот в пептид - белковых взаимодействиях. Впервые выявлена закономерная связь между

наличием идентичного фрагмента EEXEEZ в структуре RHAMM-таргет пептидов ϵ и высоким сродством их связывания с RHAMM.

изложены доказательства, что RHAMM-таргет пептиды специфично связываются с опухолевыми клетками и обладают цитотоксической, апоптотической и антиметастатической активностью,

проведен сравнительный анализ действия RHAMM-таргет пептидов на различные виды злокачественно трансформированных клеток (опухолевые клетки предстательной, молочной желез, рака яичников);

раскрыт механизм ингибирования инвазивности под действием RHAMM-таргет пептидов, которые вызывают морфологические изменения в клетках, нарушают структурную организацию актина и подавляют образование инвадоподий опухолевых клеток,

установлен факт, что популяции клеток рака молочной железы является гетерогенной и состоит из мелких злокачественных, инвазивных клеток и многоядерных гигантских, неинвазивных клеток старения,

впервые изложены доказательства, что RHAMM-таргет пептиды уменьшают количество клеток старения, и высказано предположение, что они обладают сенолитическим потенциалом,

изучена и доказана противоопухолевая активность RHAMM-таргет пептидов на животной опухолевой модели, что согласуется с результатами, полученными на клеточных моделях;

проведена адаптация существующих методов для оценки эффекта пептидов на жизнеспособность, пролиферацию, апоптоз, некроз, инвазивность опухолевых клеток, обеспечивших получение новых результатов по теме диссертации.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработан новый комплекс биоинформационных методов для идентификации опухоль - таргетных пептидов и универсальные методики анализа

специфичности связывания RНАММ-таргет пептидов с RНАММ рецептором;

разработан новый подход - таргетная терапия для диагностики и лечения онкологических заболеваний, с применением RНАММ-таргет пептидов, специфичных блокаторов ГК/RНАММ сигнального пути;

разработана эффективная методика получения рекомбинантного RНАММ-СТ с помощью генной инженерии, позволяющая получить гомогенный белок с высоким выходом, защищенная международным патентом (D. Naor, N. P. Akentieva, E. Turley. International Patent № 12459. June 2013. 40 Yissum Research Development company of the Hebrew University of Jerusalem, Israel. United States Provisional Patent Application No. 62/560,790 «Rhamm-derived peptide for treatment of diabetes» – Ref: 2513453 SL/nb);

внедрены современные методы исследования, представленные в диссертационной работе, в научно-исследовательскую работу и образовательный процесс студентов, аспирантов Отдела кинетики химических и биологических процессов Института Проблем химической физики Российской Академии наук;

определены перспективы практического использования флуоресцентно-меченых RНАММ-таргет пептидов для создания молекулярных зондов для ранней неинвазивной диагностики злокачественных новообразований;

доказан терапевтический потенциал RНАММ-таргет пептидов для лечения онкологических заболеваний. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды обладают цитотоксической, апоптотической, сенолитической и антиметастатической активностью;

создана система практических рекомендаций для применения RНАММ-таргет пептидов в клеточной терапии злокачественных новообразований за счет индукции апоптоза, некроза, подавления роста и инвазивности опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*;

представлены рекомендации для дальнейшей коммерциализации RНАММ-таргет пептидов на основе их специфичности действия, допускающие их трансляцию в клиническую практику с перспективой проведения доклинических испытаний;

Впервые получены обширные фундаментальные знания о модуляции активности RНАММ рецептора, механизме действия RНАММ-таргет пептидов, предложены перспективы практического использования полученных знаний для тераностики онкологических заболеваний.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

экспериментальные работы выполнены на высоком научно-методическом уровне, результаты получены на сертифицированном, поверенном оборудовании, на достаточном экспериментальном материале, с применением современных методов исследования, с использованием уникальных моделей *in vitro* и *in vivo*, корректных методов статистического анализа, обеспечивающих достоверность и полноценность сделанных выводов; показана воспроизводимость результатов исследования, проведено необходимое количество технических повторений и адекватное количество контрольных измерений.

Теория построена на имеющихся в литературе сведениях об гиперэкспрессии RНАММ рецептора в опухолевых клетках и его важной роли в развитии и прогрессии рака. На основе опубликованных данных известно, что RНАММ является молекулярной мишенью для диагностических, прогностических и терапевтических целей в области лечения онкологических заболеваний. На этой основе сформулирована новая идея научного исследования - идентификация и синтез пептидов-антагонистов, способных специфично связываться с RНАММ рецептором на поверхности опухолевых клеток, модулировать активность RНАММ, блокировать передачу сигналов от гиалуроновой кислоты к RНАММ рецептору и тем самым подавлять пролиферацию, жизнеспособность раковых клеток на самой ранней стадии;

идея базируется на анализе и обобщении 619 зарубежных и 20 отечественных источников по теме диссертации;

в литературном обзоре и в обсуждении **использованы** данные, полученные ранее по рассматриваемой тематике;

установлено, что полученные результаты о роли RНАММ рецептора в метаболизме опухолевых клеток согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике.

использованы современные методики сбора и обработки исходной информации, которые полностью соответствуют задачам исследования. Достоверность полученных результатов базируется на количественном статистическом анализе данных, который проводился с использованием программ GraphPad Prizm, One–Way ANOVA, t-критерий Стьюдента.

Личный вклад соискателя состоит в том, что она принимала непосредственное участие в получении исходных данных, лично участвовала в планировании и постановке экспериментов на всех этапах исследования. Автором предложена научная концепция и план исследования по идентификации RНАММ-таргет пептидов и изучению их диагностического и терапевтического потенциала для лечения онкологических заболеваний. Автор самостоятельно анализировала данные научной литературы, обрабатывала и интерпретировала полученные результаты. Все результаты, представленные соискателем в диссертации, получены ей лично или под ее непосредственным руководством, а также в сотрудничестве с коллегами из Лондонского научного центра (г. Лондон, Канада). Лично автором разработан и защищен патентом метод получения и очистки рекомбинантного RНАММ-СТ белка, разработаны методики анализа специфичности связывания пептидов с RНАММ на поверхности опухолевых клеток. Соискатель лично изучала влияние RНАММ-таргет пептидов на инвазивность раковых клеток, самостоятельно работала на конфокальном микроскопе, снимала и анализировала изображения, используя программу Image J. Автор самостоятельно проводила исследования терапевтического потенциала RНАММ-таргет пептидов.

Автор лично участвовала в апробации результатов исследования на семинарах, симпозиумах, конгрессах, рабочих совещаниях, представляла стендовые доклады и выступала с устными докладами на международных и российских конференциях. Лично автором подготовлены основные публикации по выполненной работе, либо она принимала участие в их написании, основные результаты опубликованы в высокорейтинговых, международных и отечественных, рецензируемых научных журналах. Автореферат и диссертационная работа написаны лично автором.

Диссертационный совет отмечает, что диссертация Акентьевой Н.П. рассматривает основные вопросы поставленной научной проблемы по идентификации RНАММ-таргет пептидов (рецептор-гиалуронан опосредованной подвижности таргетные пептиды), специфично взаимодействующих с RНАММ рецептором (рецептор-гиалуронан опосредованной подвижности) и исследованию потенциала этих пептидов для диагностики и адресной терапии злокачественных новообразований, что подтверждается последовательным выполнением плана исследований, сформулированными задачами, концептуальностью и взаимосвязью выводов. Диссертация является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны положения для молекулярной диагностики и клеточной терапии онкологических заболеваний, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, содержащее решение научной проблемы специфичности противоопухолевых препаратов, которое вносит значительный вклад в современные представления относительно диагностического и терапевтического потенциала RНАММ-таргет пептидов и может использоваться в трансляционной онкологии для таргетной терапии злокачественных новообразований различной локализации.

Диссертация Акентьевой Натальи Павловны «RНАММ-таргет пептиды: идентификация, влияние на жизнеспособность, апоптоз и инвазивность опухолевых клеток» соответствует требованиям п. 9 Постановления Прави-

тельства РФ «О порядке присуждения учёных степеней» №842 от 24.09.2013, предъявляемым к диссертационным работам на соискание учёной степени доктора биологических наук, а её автор достойна присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – «Биохимия». В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем учёной степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

На заседании 20 декабря 2021 г Диссертационный совет принял решение присудить Акентьевой Н.П. ученую степень доктора биологических наук по специальности 1.5.4- Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 25 человек, из них 7 докторов биологических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 36 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 24, против – нет , недействительных бюллетеней – 1.

Председатель
Диссертационного Совета 24.1.241.01,
член-корреспондент РАН, профессор, д.м.н.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета 24.1.241.01, к.б.н.



Никитюк Д.Б.

Шумакова А.А.

Дата оформления заключения: «20» декабря 2021 г.