

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по диссертации на соискание ученой степени доктора наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 19 июня 2019 года № 8

О присуждении **Павлюкову Марату Самвеловичу**, гражданину Российской Федерации, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Роль апоптоза в трансформации опухолей: новые подходы к терапии глиом» по специальности 03.01.03 – молекулярная биология принята к защите 20 февраля 2019 г., протокол №4 диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Российская Федерация, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель Павлюков Марат Самвелович, 1988 г. рождения. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Создание нового ингибитора Сурвивина на основе изучения опухолеспецифичных функций этого белка» защитил в 2013 году в диссертационном совете Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (диплом кандидата наук: серия ДКН № 190532). Работает старшим научным сотрудником лаборатории мембранных и биоэнергетических систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Диссертация выполнена в лаборатории мембранных и биоэнергетических систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Купраш Дмитрий Владимирович, член-корреспондент РАН, профессор РАН, доктор биологических наук, гл.н.с. лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН);

Бабаков Алексей Владимирович, профессор, доктор биологических наук, гл.н.с. лаборатории стрессоустойчивости растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ);

Сащенко Лидия Павловна, профессор, доктор биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной иммуногенетики рака Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН),

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, г.

Москва, в своем положительном заключении, составленном Балабаном Павлом Милославовичем, членом-корреспондентом РАН, доктором биологических наук, профессором, заведующим лабораторией клеточной нейробиологии обучения, и утверждённом директором, доктором биологических наук, профессором РАН Малышевым Алексеем Юрьевичем, указала, что по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне диссертация Павлюкова Марата Самвеловича полностью соответствует требованиям «Положения 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), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор Павлюков Марат Самвелович заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Соискатель имеет 33 опубликованные работы, из них по теме диссертации опубликовано 20 научных работ общим объемом 25 печатных листов в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, из них 1 обзор. Соискателем опубликована 21 работа в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации, в которые автор внес основной либо существенный вклад:

1. **Marat S. Pavlyukov**, Nadezhda V. Antipova, Maria V. Balashova, Tatjana V. Vinogradova, Evgenij P. Kopantzev, Mihail I. Shakhparonov. Survivin Monomer Plays an Essential Role in Apoptosis Regulation. *J Biol Chem*. 2011, 286(26): 23296-23307.
2. **Pavlyukov MS**, Antipova NV, Balashova MV, Shakhparonov MI. Detection of Transglutaminase 2 conformational changes in living cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012, 421(4): 773-779.
3. Guvenc H.*, **Pavlyukov M.S.***, Kurt H., Banasavadi-Siddegowda Y.K., Mao P., Hong C., Yamada R., Kwon C.H., Bhasin D., Chettiar S., Kitange G., Park I.H., Sarkaria J. et al. Impairment of glioma stem cell survival and growth by a novel inhibitor for Survivin/Ran protein complex. *Clin Cancer Res*. 2013, 19(3): 631–642. ***Равный вклад**
4. Victoria O. Shender*, **Marat S. Pavlyukov***, Rustam H. Ziganshin, Georgij P. Arapidi, Kovalchuk S.I., Anikanov N.A., Altukhov I.A., Alexeev D.G., Butenko I.O., et al. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication. *Mol Cell Proteomics*. 2014, 13(12): 3558-3571. ***Равный вклад**
5. Peng Cheng, Jia Wang, Indrayani Waghmare, Stefania Sartini, Vito Coviello, Sung-Hak Kim, Ahmed Mohyeldin, **Marat S. Pavlyukov**, Mutsuko Minata, Valentim C.L., et al. FOXD1-ALDH1A3 signaling is a determinant for the self-renewal and tumorigenicity of mesenchymal glioma stem cells. *Cancer Res*. 2016, 76(24):7219-7230.
6. Jia Wang, Peng Cheng, **Marat S Pavliukov**, Yu H., Zhang Z., Kim S.H., Minata M., Mohyeldin A., Xie W., Chen D., Goidts V., Frett B., et al. Targeting NEK2 attenuates glioblastoma growth and radio-resistance via de-stabilizing EZH2. *J Clin Invest*. 2017, 127(8): 3075-3089.
7. **Marat S. Pavlyukov**, Hai Yu, Bastola S., Minata M., Shender V.O., Lee Y., Zhang S., Wang J., Komarova S., Wang J., Yamaguchi S., Alsheikh H.A., et al. Apoptotic cell-derived extracellular vesicles promote malignancy of glioblastoma via intercellular transfer of splicing factors. *Cancer Cell*. 2018, 34(1): 119-135.
8. Ksenia S. Anufrieva, Victoria O. Shender, Georgij P. Arapidi, **Marat S. Pavlyukov**, Shakhparonov M.I., Shnaider P.V., Butenko I.O., Lagarkova M.A., Govorun V.M. Therapy-induced stress response is associated with downregulation of pre-mRNA splicing in cancer cells. *Genome Med*. 2018, 10(1): 49.

9. M. I. Shakhparonov, N. V. Antipova, V. O. Shender, P. V. Shnaider, G. P. Arapidi, N. B. Pestov, **M. S. Pavlyukov**. Expression and Intracellular localization of Paraoxonase 2 in different types of Malignancies. *Acta Naturae*. 2018, 10(3): 92-99.
10. N. P. Fadeeva, N. V. Antipova, V. O. Shender, K. S. Anufrieva, G. A. Stepanov, S. Bastola, M. I. Shakhparonov, **M. S. Pavlyukov**. Identification of Novel Interaction Partners of AIF Protein on Outer Mitochondrial Membrane. *Acta Naturae*. 2018, 10(4): 58-67.
11. **M. S. Pavlyukov**, A. A. Gulin, A. A. Astafiev, V. Yu. Svetlichny, S. K. Gularyan. Lateral Heterogeneity of Cholesterol Distribution in Cell Plasma Membrane: Investigation by Microfluorimetry, Immunofluorescence, and TOF-SIMS. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2019, 13(1): 50-57.
12. Mutsuko Minata, Alessandra Audia, Junfeng Shi, Songjian Lu, Joshua Bernstock, **Marat S. Pavlyukov**, Das A., Kim S.H., Shin Y.J., Lee Y., Koo H., Snigdha K., Waghmare I., Guo X., Mohyeldin A., Gallego-Perez D., Wang J., et al. Phenotypic Plasticity of Invasive Edge Glioma Stem-like Cells in Response to Ionizing Radiation. *Cell Rep*. 2019, 26: 1893-1905.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента Купраша Дмитрия Владимировича, отзыв положительный, содержит следующие замечания: Рисунок 31 имеет недостаточно высокое разрешение, в результате не все обсуждаемые в тексте наблюдения можно рассмотреть. Имеются недочеты в согласовании слов и пунктуации. Список ключевых материалов приведен на английском языке, в то время как в тексте некоторые из использованных реагентов называются по-русски. Не приведены последовательности синтетических олигонуклеотидов. В главе 4.1.2 не удалось обнаружить информации о том, какая линия клеток использовалась. Недостаток информации о том, какие клетки использовались, имеется и далее по тексту. Так, на рис. 48 показаны результаты по локализации PON2 в нескольких клеточных линиях, а на рис. 49 - в какой-то одной, но не сказано, в какой. На ряде рисунков автор не уделил достаточно внимания деталям. В качестве примеров можно привести рисунок 43, где на панели А аннотация не позволяет понять, какая из полос является специфической, а на панели Б легенда обозначает лишь 3 кривые из 5. Другой пример - рисунок 59, где на панели А резко выделяется "Взаимодействие организмов", - единственная категория белков, которыми обогащены контрольные везикулы (в отличие от везикул, выделяемых апоптотическими клетками глиобластомы). Это бросающееся в глаза наблюдение не только нигде не обсуждается, но и обозначено с опечаткой. В списке ключевых материалов приведены две линии иммунодефицитных мышей, мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом NOD scid и "голые" бестимусные мыши NU/J, однако о том, каких мышей использовали в каждом конкретном эксперименте, информации нет: в разделе "Материалы и Методы" сказано лишь, что использовали либо тех, либо других. Как и в случае с культурами клеток, эту информацию следовало включить в подписи под рисунками. Ингибиторы сурвивина, киназы NEK2 и альдегид дегидрогеназы ALDH1A3, полученные в ходе работы, преждевременно называть противоопухолевыми препаратами, пока это в лучшем случае базовые соединения. Можно также отметить, что вывод 7, посвященный этим веществам, перегружен цифрами, в результате чего отличается от остальных, похвально лаконичных.

2. Отзыв официального оппонента Бабакова Алексея Владимировича, отзыв положительный, содержит следующие замечания: В заключительной части обзора литературы следовало более развернуто сформулировать цели и задачи исследования, что

способствовало бы лучшему пониманию логики работы. Также в обзоре литературы экзосомам животных клеток уделено слишком мало внимания, и потому при чтении диссертации складывается впечатление, что о них мало что известно, однако это не совсем верно. Из результатов, полученных автором, не ясно, относится ли наблюдаемый эффект везикул к кросс-адаптации, при которой один вид стрессового воздействия увеличивает устойчивость к другому, или в данном случае проявляется и специфичность ответа.

3. Отзыв официального оппонента Сащенко Лидии Павловны, отзыв положительный, содержит следующие замечания: Некоторые выводы очень кратки и мало информативны, это затрудняет оценку полученных результатов. Цитирование статей, опубликованных в российских журналах, на английском языке, неприятно удивляет.

4. Отзыв ведущей организации, отзыв положительный, содержит следующие замечания: Ни в автореферате, ни в тексте диссертации нет отдельно выделенных «Положений, выносимых на защиту», хотя неявно они присутствуют в тексте. Хотелось бы во время защиты услышать такие Положения, обсуждение их новизны для всей области. Структурно диссертация построена хотя и со всеми необходимыми разделами, но по сути Обзор литературы несколько чужероден остальному тексту, так как анализ существующих данных по теме не заканчивается необходимостью (задачей) конкретного исследования по конкретной части работы. Несколько сбивает понимание работы использование термина «эволюция опухолей», так как в общебиологической литературе в 90% случае употребляют это словосочетание как «роль опухолей в эволюции организмов». По сути понятно, о чем идет речь (стадии развития опухолей), но по факту это жаргонизм, применяемый в данной области.

5. Отзыв на автореферат Потапова Александра Александровича, академика РАН, директора НИИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко МЗ РФ, отзыв положительный, содержит следующие замечания: Излишне краткое описание некоторых ключевых экспериментов, а также неудачные формулировки и опечатки, встречающиеся в тексте работы.

6. Отзыв на автореферат Лагарьковой Марии Андреевны, члена-корр. РАН, заведующей лабораторией клеточной биологии Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА, отзыв положительный, содержит следующие замечания: Не стоило название русского журнала «Биоорганическая химия» давать в списке публикаций в его английской версии.

7. Отзыв на автореферат Штиля Александра Альбертовича, д. мед. н., заведующего лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток НИИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина МЗ РФ, отзыв положительный, содержит следующие замечания: К недостаткам автореферата можно отнести стилистические погрешности. В работе исследована глиобластома, а в тексте встречается понятие “рак” - правильно “злокачественная опухоль”. Имеются неудачные выражения (“клетка защищает себя”, “некротическая зона, содержащая апоптотирующие клетки”, “убивать клетки” и др.). В выводах можно избежать формулировок “исследованы”, “предположен механизм” - в работе установлены принципиально новые уникальные результаты, их следует убедительно выразить. Правомерно ли утверждать, что “созданы препараты”? Представляется, что

выявлены “кандидаты”; предстоит долгий путь к созданию действительно новых оригинальных препаратов на основе открытий автора.

8. Отзыв на автореферат Карповой Ольги Вячеславовны, д.б.н., заведующей кафедрой вирусологии Биологического факультете МГУ имени М.В. Ломоносова, отзыв положительный, замечаний не содержит.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их достижениями в областях науки, соответствующих теме представленной диссертации. Это подтверждается имеющимся у них значительным количеством публикаций в ведущих российских и международных научных журналах. Стоит отметить, что сотрудниками Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН ведутся работы по изучению роли апоптотических механизмов в функционировании клеток нервной системы, а также исследования межклеточных взаимодействий между клетками головного мозга человека. Научные интересы Бабакова А.В. и сотрудников его лаборатории тесно связаны с изучением молекулярных механизмов ответа клеток на стресс. Сащенко Л.П. известна своими фундаментальными и прикладными работами по изучению механизмов гибели опухолевых клеток под действием цитотоксических лимфоцитов. Купраш Д.В. является одним из ведущих специалистов в области механизмов работы внутриклеточных сигнальных путей и взаимодействия злокачественных опухолей с иммунной системой. Наличие солидного опыта и высокой квалификации в приведенных выше областях позволяет им объективно судить о научной новизне, а также теоретической и практической значимости диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных исследований Павлюкову М.С. удалось получить значительное количество новых и важных данных в области молекулярной и клеточной биологии:

Во-первых, была разработана система, основанная на безызлучательном переносе энергии (FRET), позволившая проследить за изменением конформации фермента Трансглутаминаза 2 на ранних стадиях апоптоза. Во-вторых, автором был продемонстрирован новый механизм межклеточной коммуникации раковых клеток. В работе Павлюкова М.С. было показано, что апоптотические клетки глиобластомы секретируют сплайсосомные белки внутри мембранных пузырьков – везикул, и эти везикулы способны изменять тип сплайсинга пре-мРНК в реципиентных выживших клетках. Полученные диссертантом экспериментальные данные позволили определить механизмы, лежащие в основе экспорта сплайсосом из клеток доноров и эффекта внеклеточных факторов сплайсинга на клетки реципиенты. Важно отметить, что автором был не только продемонстрирован новый путь межклеточной коммуникации, но и подробно изучена роль этого процесса в развитии опухолей головного мозга. Павлюковым М.С. было показано, что внеклеточные сплайсосомные белки появляются после терапии, а также при достижении опухолью достаточно больших размеров и способствуют мезенхимальной трансформации клеток глиобластомы. Таким образом, автор, с одной стороны, продемонстрировал новый механизм межклеточной коммуникации, а с другой стороны, показал, что этот механизм способен объяснить причину фенотипических изменений опухолей мозга, часто наблюдаемых в клинической практике. На основе полученных результатов автором были предположены три наиболее перспективные мишени для терапии глиобластом и

протестированы новые низкомолекулярные ингибиторы выбранных белков. Эффективность этих соединений была подтверждена при анализе ферментативной активности рекомбинантных белков, а также на первичных культурах клеток глиобластомы *in vitro* и на мышинных моделях человеческой глиобластомы *in vivo*. Благодаря исследованиям диссертанта был достигнут наиболее значительный прикладной результат работы – продемонстрировано, что соединение СМР3а (5-[7-{1-[2-(диметиламино)этил]-1H-пиразол-4-ил}имидазо[1,2-а]пиридин-3-ил]-3-{(1R)-1-[2-(трифторметил)фенил]этокси}тиофен-2-карбоксамид) способно ингибировать киназу NEK2, убивать стволовые клетки глиобластомы в наномолярных концентрациях, а также увеличивать их чувствительность к радиотерапии. Наконец, в заключительной части работы Павлюковым М.С. был предложен новый способ детекции распределения противоопухолевого препарата цисплатина и низкомолекулярных метаболитов, в том числе холестерина, глутамина, моноацилглицерина, холина и т.д., в клетках и срезах глиобластомы с помощью TOF-SIMS масс-спектрометрии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, результаты воспроизводимы в различных условиях, а методы исследования, предложенные и разработанные соискателем, прошли независимую экспериментальную проверку в нескольких лабораториях в России и за рубежом.

Личный вклад соискателя состоит в том, что он принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, выборе методов, анализе и подготовке результатов к публикации. Все экспериментальные данные за исключением компьютерного моделирования и химического синтеза низкомолекулярных ингибиторов, а также масс-спектрометрии были получены лично Павлюковым М.С., либо под его непосредственным руководством. Химический синтез был осуществлён зарубежными коллабораторами (Ин Хе Пак (Университет Огайо, Колумбус, США), Хонг Ю Ли (Университет Аризоны, Туксон, США) и Вито Ковизелло (Университет Пизы, Пиза, Италия)) на основе данных автора по исследованию молекулярного механизма действия соответствующих белков. Масс-спектрометрия была проделана Шендер Викторией Олеговной и Зиганшином Рустамом Хусмановичем (Лаборатория протеомики, ИБХ РАН, Москва, Россия).

На заседании 19 июня 2019 г. диссертационный совет принял решение присудить Павлюкову Марату Самвеловичу ученую степень доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 7 докторов наук (по специальности диссертации 03.01.03 – Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение учёной степени - 19, против присуждения учёной степени - 1, недействительных бюллетеней - 1.

Председатель
диссертационного совета
академик РАН

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор физ.-мат. наук



Иванов Вадим Тихонович

*Олейников Владимир Александрович