

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ГНЦ ИБХ РАН)**

СТЕНОГРАММА

Заседание диссертационного совета 24.1.037.01

27 ноября 2024 г.

Защита диссертации

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Фроловой Анастасии Юрьевны

**По теме: «Мультифункциональные гибридные структуры
для тераностики раковых заболеваний»**

Специальность – 1.4.9 – Биоорганическая химия

Москва – 2024 г

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 27 ноября 2024 года.

Председатель

диссертационного совета

акад., д.х.н. Анатолий Иванович Мирошников

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.ф.-м.н. Владимир Александрович Олейников

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 8.

1.	Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
2.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
3.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
4.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
5.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
6.	Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
7.	Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
8.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
9.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
10.	Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.4.9)
11.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
12.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
13.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Мирошников Константин Анатольевич	(1.5.6)
14.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
15.	Д.б.н.	Рубцов Юрий Петрович	(1.5.3)
16.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
17.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
18.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
19.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
20.	Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(1.4.9)

Мирошников А.И.: Диссертация Анастасии Юрьевны Фроловой «Мультифункциональные гибридные структуры для тераностики раковых заболеваний» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9.-Биоорганическая химия. Научный руководитель Владимир Иванович Мартынов, доктор химических наук. Работа выполнена в лаборатории молекулярной тераностики ИБХ. Официальные оппоненты. Пометун Анастасия Александровна, доктор химических наук, заведующая лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии А.Н. Баха. Отсутствует по уважительной причине. И Абакумов Максим Артемович, кандидат химических наук, доцент кафедры медицинских, нанобиотехнологий медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова. Ведущая организация — Федеральное научное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук. Пожалуйста.

Олейников В.А.: *(Зачитывает материалы личного дела соискателя.)* Материалы личного дела. Фролова Анастасия Юрьевна, Российская Федерация, окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования МИРЭА, это российский технологический университет, по направлению подготовки биотехнология, это в 2018 году было. В 2022 году окончила аспирантуру нашего института, ГНЦ ИБХ РАН, по специальности 1.4.9.-Биоорганическая химия. С 2020 года по настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории молекулярной тераностики отдела иммунологии ГНЦ ИБХ РАН. Кандидатский экзамен по специальности «биоорганическая химия» сдан с оценкой «отлично». Работа выполнена в лаборатории молекулярной тераностики нашего института. Научный руководитель – Мартынов Владимир Иванович, доктор химических наук, руководитель лаборатории. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК 26 сентября 2024 года, то есть вовремя, и все необходимые документы в деле имеются.

Мирошников А.И.: Спасибо. Вопросов к очередному секретарю нет. Значит, пожалуйста, Анастасия Юрьевна.

Фролова А.Ю.: *(Излагает основные положения диссертационной работы.)*

Мирошников А.И.: Спасибо. Так, вопросы? Пожалуйста.

Овчинникова Т.В.: Вы говорили, что основное накопление происходит в почках. Можете прокомментировать этот график на слайде 21?

Фролова А.Ю.: На этом графике не представлено сигнала по почкам, потому что данные конструкции обладают достаточно маленьким молекулярным весом, приблизительно около 30 кДа и они подвергаются выведению почками. Данное накопление неспецифично. Оно характерно и для контрольного белка, который просто подвергается подобному

выведению почками. Для того, чтобы конструкции циркулировали и не подвергались выведению, необходимо, чтобы они обладали молекулярным весом примерно равным 65 кДа.

Мирошников К.А.: Спасибо за доклад. У меня возник вопрос касательно упомянутых линкеров между пептидом и флуоресцентным белком. Я обратил внимание, что и в короткий линкер и шестнадцатичленный линкер вы очень смело вводили в состав цистеин. Известно, что при рН в районе 6 происходит протонирование дисульфидной связи. Можете прокомментировать, зачем в состав линкера включали цистеин и наблюдали ли Вы спонтанную димеризацию?

Фролова А.Ю.: Введение цистеина было произведено для возможности дальнейшего мечения гидрофобными и гидрофильными низкомолекулярными метками данных конструкций. Как раз в месте линкера. Это было нужно для изучения конъюгатов белков и синтетических меток. Мы проводили гель-фльтрационный анализ для всех конструкций и наблюдали олигомеризацию для всех конструкций вне зависимости от присутствия цистеина в составе линкера. Мы это связываем с тем, что сам по себе пептид, поскольку является трансмембранным доменом бактериородопсина – достаточно гидрофобен и может взаимодействовать сам с собой.

Долгих Д.А.: Извините, пожалуйста, пептиды, которые Вы использовали, не структурированы в физиологических условиях. Когда Вы присоединяете к ним длинные линкеры, присоединяете белки, что с ними происходит? Есть ли какая-то информация? Не влияет ли это на структуру пептидов? Становятся ли они структурированными? Можете прокомментировать?

Фролова А.Ю.: Ранее такой информации не существовало, поэтому и началась эта диссертационная работа по данной тематике. Существовало всего две конструкции по данной теме и подробно их свойства не обсуждались. Поэтому нами и были выбраны модели, в которой в качестве белковой компоненты был флуоресцентный белок, поскольку мы могли оценить влияние пептида на его упаковку за счет эффективности синтеза хромофора. И в каких-то случаях эта эффективность значительно менялась, в каких-то – нет. В случае получения конструкций на основе белков mCherry вне зависимости от типа линкера, в целом, эффективность синтеза хромофора была достаточно высока, выше 90%, однако в случае получения белков на основе EGFP эта эффективность синтеза уменьшалась. По поводу приобретения определенной структуры и формы в ходе получения таких гибридных конструкций такой информации нет, но мы прослеживаем влияние.

Мирошников А.И.: Спасибо. Еще вопросы? Не вижу. Спасибо. Отдохните пока. Так, Владимир Иванович, пожалуйста, вам слово.

Мартынов В.И.: Анастасия Юрьевна пришла к нам в лабораторию еще студентом. С первого года она занялась данной тематикой. Хочу сказать, что на то время в лаборатории

не было никакого опыта в работе с клеточными культурами, не было необходимого оборудования. Так что Анастасия Юрьевна начала эту работу, можно сказать, с нуля. Она ее поднимала. Она является основным исполнителем этой работы, что отражено в публикациях, где она везде первый автор. Ну что, как можно сказать об Анастасии Юрьевне? Ну, в двух словах. Во-первых, это тщательность в выполнении всех экспериментов. Даже, казалось бы, положительные результаты, проверялись по несколько раз различными способами. Также это высокая степень ответственности диссертанта. В результате работы она освоила все современные методы, выполнила все поставленные задачи на высоком методическом уровне. Поэтому я могу лишь рекомендовать совету для ее аттестации в качестве кандидата в химических наук.

Мирошников А.И.: Спасибо. Владимир Александрович, пожалуйста.

Олейников В.А.: *(Зачитывает заключение организации, где выполнялась работа, заключение положительное.)* Так, ну, значит, возвращаемся к тому, что работа выполнена в нашем институте по, соответственно, заключению от Института биорганической химии. Научный руководитель – Мартынов Владимир Иванович – только что выступил. Тема диссертационной работы утверждена ученым советом в 2018 году, 19 декабря. Работа обсуждена на открытом межлабораторном семинаре отдела иммунологии. По итогам обсуждения принято следующее заключение. Во-первых, подчеркивается актуальность, ну и, естественно, то, что сегодня уже много раз говорила, важность борьбы с раковыми заболеваниями, и тут в качестве параметра выступает физиологический уровень рН, который во внеклеточном пространстве опухоли ниже, порядка 6,0-6,7. Ну, вот это фактически такой подход. И целью данной работы являлось изучение совместимости рНЛIP-технологии с белковыми компонентами, проверка ее потенциала по доставке высокомолекулярной нагрузки к раковым клеткам с целью получения новых агентов для тараностики рака в будущем. Личное участие здесь, так сказать, подчеркивается, тем, что проведены с 2018 по 2022 годы работы. Личный вклад диссертанта складывается из непосредственного участия в выборе направления научного поиска, разработке цели, задачи исследования, проведении клеточных, молекулярных и других исследований, обоснования полученных результатов. Степень достоверности сомнений не вызывает, так как исследования проведены с помощью современных методов, и этих методов использовано достаточное количество. Новизна и практическая значимость. Опять же, полученные данные обладают огромной ценностью для разработки эффективных агентов на основе белков и пептидов рНЛIP, и, соответственно, для тараностики рака. Ценность научных работ, еще подчеркивается тем, что она была поддержана грантом на лучший проект фундаментальных научных исследований, это раздел «Аспиранты». Результаты диссертационной работы, опубликованы в трех статьях в рецензируемых научных отечественных и зарубежных журналах и представлены на пяти российских и международных научных конференциях. Ну и, соответственно, проверка на оригинальность и отсутствие заимствования. Все там в порядке. Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что диссертационная работа Фроловой А.Ю.

соответствует заявленной специальности 1.4.9-Биоорганической химии, химические науки, соответственно, подчеркивается, что соответствует положениям о присуждении ученых степеней, и в результате заключения пишется, что работа Фроловой Анастасии Юрьевны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук. Это принято на заседании открытого межлабораторного семинара отдела иммунологии. Подписано председателем семинара академиком Деевым Сергеем Михайловичем, старшим научным сотрудником Пахомовым А.А. и заместителем директора Ямпольским И.В. Соответственно, заключение утверждено директором нашего института Александром Габибовичем Габибовым. Это было в сентябре 2023 года.

Теперь отзыв ведущей организации (*зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв положительный*), в качестве которой выступает Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии. Опять же, отзыв ведущей организации полностью положителен. Актуальность исследования во многом связана с важностью борьбы с раковыми заболеваниями. Подчеркивается, что это направление пониженного уровня рН в качестве направляющего фактора, что это важно. Научная новизна. Настоящая работа направлена на разработку генноинженерных подходов к созданию таргетных противораковых препаратов на основе пептидных нацеливающих составляющих, включающих, помимо пептидной, еще две составляющие — визуализирующую и терапевтическую. Данный подход, возможно, позволит решить комплексную проблему ранней диагностики и терапии онкологических заболеваний. Практическая и теоретическая значимость работы. Опять же, здесь это подчеркивается, что результаты значимы теоретически и практически. Методики получения гибридных рН-чувствительных конструкций, направленного на раковые клетки действия, могут быть использованы в учебном процессе высших учебных медицинских фармакологических заведений, полученные автором результаты имеют большое значение для фармацевтической науки, и в будущем могут быть использованы и внедрены в медицинскую практику. Указаны также здесь ряд организаций, в которых эти результаты могут быть использованы. Степень достоверности также гарантируется комплексностью работы и воспроизводимостью результатов. Материалы диссертации представлены на пяти российских и международных конференциях. Ну и общая характеристика – это 123 страницы текста 244 источника и, соответственно, по разделам: введение, литературный обзор, по которому говорится, что последовательно изложен материал о причинах и механизмах закисления, возникновения опухолевого ацидоза, а также представлены современные сведения о методах воздействия и способах нацеливания на кислотное микроокружение опухоли. Материалы и методы достаточно подробны. Результаты и их обсуждение последовательно изложены результаты работы, ну, то, что мы сегодня слышали, поэтому не буду особенно на этом акцентировать внимание. В разделе заключение суммируются итоги выполненного исследования. Диссертационная работа является подробным и обстоятельным исследованием, построена стройно, логично и так далее. Значит, имеющиеся замечания о необходимости указания источника

использованных в работе клеточных линий, указано и о том, что автор не избежал пропуска ряда опечаток, пунктуационных и орфографических ошибок. Эти замечания не носят принципиального характера, не снижают ценности проделанных работ. Работа, безусловно, является важным и оригинальным научным исследованием, и в заключении пишется, что диссертационная работа правовой Анастасии Юрьевны соответствует критериям, в том числе девятому пункту, установленным положением присутствия неученых степеней, а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9-Биоорганическая химия, подписал научный руководитель ИФАВ РАН, руководитель отдела медицинской и биологической химии, академик РАН Бачурин Сергей Олегович. Отзыв утвержден заместителем директора по научной работе Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии РАН Золотухиной Е.В.

Мирошников А.И.: Спасибо, но, насколько я понял, там замечаний особых нет. Отвечать будете?

Фролова А.Ю.: Я прокомментирую замечания по поводу источника клеточных линий. Нам они были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории молекулярной иммунологии и белков гормональной регуляции, которые, в свою очередь, ранее их приобрели из коммерчески доступных источников. За опечатки в работе мне искренне жаль, я пыталась их избежать, но буду в следующий раз более внимательной.

Мирошников А.И.: Спасибо. Отзывы на автореферат.

Олейников В.А.: В совет поступили отзывы на авторитет, их два этих отзыва (*излагает содержание отзывов, отзывы положительные*). Значит, отзывы положительные, вот первый отзыв, полностью положительный, здесь все хорошо, подписано кандидатом химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химической регуляции биокатализа, это бюджетное учреждение науки, Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, подписала Морозова Елена Андреевна. И второй отзыв, ну тут пишется, автореферат написан хорошим научным языком, основные положения диссертационной полностью отражены выводы, цели работы достигнуты, но при прочтении автореферата у меня возникло несколько уточняющих вопросов, которые ни в коей мере не снижают значимость и полноту проведенного исследования. Первое. Автор в работе использует наряду с пептидом рНLIP пептид АTRAM. Однако он не приводит сравнение характеристик этих двух пептидов, которые бы объяснили причину включения этого пептида в исследование. Второе. Эксперименты на животной модели опухолевого процесса в автореферате описаны только для химерного белка, содержащего АTRAM пептид, но не рНLIP. Проводились ли такие эксперименты для рНLIP конструкции, если нет, чем обусловлен выбор именно АTRAM пептида для этих экспериментов? Ну, а в целом, значит, соответствует требованиям положения порядка присуждения ученых степеней, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических

наук по специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия. Доцент химического факультета МГУ, кандидат биологических наук Анисенко Андрей Николаевич, подписал.

Мирошников А.И.: Спасибо. Настя, отвечайте на эти два вопроса.

Фролова А.Ю.: Вопрос по поводу сравнения характеристик пептида ATRAM и rHLIP. На самом деле, это сравнение характеристик было, в частности, это были характеристики рН-зависимого связывания данных конструкций. Конструкция, которая демонстрировала наиболее эффективное связывание при понижении рН, содержала пептид ATRAM. Собственно, поэтому она и была протестирована на животных моделях. О свойствах данных пептидов и их сравнении между собой сообщалось ранее в литературных данных, собственно, преимущество пептида ATRAM подтвердилось и в нашей работе.

Мирошников А.И.: Спасибо. Значит, официальный оппонент – Максим Артемович Абакумов, пожалуйста.

Абакумов М.А.: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный).* Здравствуйте, коллеги. С большим удовольствием прочитал диссертационную работу, она действительно посвящена актуальной проблеме. И, стоит отметить, что на данный момент биотехнологические подходы в терапии онкологических заболеваний занимают все больше и больше места. Это и успехи CAR-T терапии, чекпоинт ингибиторов, это онколитические вирусы. И, в общем, данная диссертация, как мне кажется, как раз посвящена еще одному такому подходу – использованию рН-чувствительных пептидов, которые обеспечивают более избирательную доставку в опухолевую ткань за счет особенностей метаболизма в опухоли. Довольно перспективное направление, которое направлено на некие общие паттерны у опухолей и, может быть, в дальнейшем будет расширено на какую-то более или менее широкую когорту пациентов. Сама по себе работа мне понравилась, в ней исследованы различные пептиды, получено большое количество конструкций. Видно, что человек все это отработал, что это делается довольно легко. Линкеры поменяны, пептиды поменяны. В общем, хорошо, что у нас есть такие группы и такие люди, которые все это освоили, для которых это все не составляет труда. Методы, которыми проведено исследование, тоже убедительно использованы, как фокальную микроскопию, проточную цитофлуориметрию. В целом, каких-то вопросов у меня по методам нет. Но, конечно, при прочтении диссертации у меня возникло определенное количество вопросов, которые не являются критическими. На самом деле, на ряд из них я уже увидел ответы в презентации, но у меня была диссертация, был автореферат, я что читал, то и анализировал. Поэтому я, наверное, начну с недостатков, с вопросов, которые у меня возникли. Не было указано, каким образом подтверждалась та или иная конструкция, которая была вставлена в плазмиду, что она осталась целой, и какая она, в конце концов, была получена. Мне не совсем понятно, коллеги использовали несколько линкеров, один совсем коротенький, из двух аминокислот, потом восьми, потом длинный, по-моему, из шестнадцати. В какой-то момент они использовали для одного белка EGFP коротенький линкер, но восьми аминокислотный для mCherry. Почему нельзя

было взять один? Там, где исследуют сравнение рН-чувствительности пептида рНЛIP и АTRAM, у них разные кинетики рН-зависимости. Например, у АTRAM пептида как раз в отличие от обычной S-образной кривой наблюдается небольшой пик при рН 6-6,2, в работе это не было обсуждено, у меня возникли вопросы. Есть дальше исключительно не сутевые вопросы, а по написанию. В частности, замечательные выводы, хорошие результаты, в нем написана некая фраза о том, что показано получение рН-чувствительных конструкций, обладающих высокой эффективностью, это нетривиальная задача, свойство может зависеть от взаимодействия с рН-чувствительным пептидом, которое зачастую является неочевидным. Вроде вся диссертация это показывает, зачем-то это написано, не очень понятно. Значит, есть глава по исследованию олигомеризации гибридных конструкций, о том, что они самопроизвольно собираются, это не было объяснено. В экспериментах *in vivo* было указано, что почки являются органом, который в основном накапливает эти белки, но почему-то данных по ним приведено не было. Ну, конечно, в диссертации присутствуют опечатки. Тем не менее, это не критические замечания, и даже они скорее носят характер какого-то моего природного любопытства и вопросов, на которые мне хотелось получить ответы. Сама диссертация, безусловно, и диссертант соответствуют всем критериям, в том числе пункту 9. Можно я не буду их зачитывать, наверное, все их знают. И диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9.-Биоорганическая химия.

Мирошников А.И.: Спасибо. Ну, удовлетворите любопытство оппонента.

Фролова А.Ю.: Первое замечание, которое сделал оппонент, касалось подтверждения первичной структуры белков и их гибридных конструкций, их целостности. Конечно, мы секвенировали полученные генетические конструкции, а целостность белковых конструкций подтверждали при помощи электрофореза. Далее вопросы, замечания, касающиеся перехода от использования одних типа линкеров к другим. На самом деле, на начальном этапе этой работы не планировалось такое изучение, поэтому мы начали с наиболее очевидного линкера – глицин-серинового. И только потом, по ходу изучения литературных данных, решили дополнить данное исследование другим линкером, который у нас использовался в лаборатории в сочетании с белком EGFP. Он был слегка удлинен, но все же содержал последовательность глицин-серин. И мы увидели изменение свойств целевых конструкций. Поэтому далее на основе второго используемого нами линкера был получен новый линкер, который содержал все тот же, но был удлинен последовательностью аминокислот, отрицательно заряженных, что, по всей видимости, и обусловило успех данной конструкции. Остальные линкеры были использованы также в работе лаборатории при сочетании mCherry с какими-либо другими белковыми структурами. Вопрос, касающийся, формы кривых рН-зависимости. Действительно, в случае использования белка EGFP наблюдалась S-образная кривая, в то время как с белком mCherry наблюдался некий максимум, причем в случае тестирования всех конструкций. Мы связываем это со свойствами самого белка. Белок mCherry несколько

отличается от белка EGFP, во-первых, за счет зарядов на поверхности барреля этого флуоресцентного белка, что, может быть, и является ответом на данный вопрос. При понижении рН данная белковая молекула может вести себя иным образом, чем EGFP. Вопрос, связанный с неудачной фразой, точнее общей фразой, которая как бы повторяет сделанные выводы. Да, она подытожила раздел обсуждений и результатов моей диссертации, поэтому я решила ее использовать. Она очень емкая и, как бы, является итогом проделанной работы. Далее был вопрос, касающийся анализа данных конструкций при помощи гель-фильтрации. Наиболее эффективно связывающиеся конструкции на основе рН-чувствительных пептидов были подвергнуты этому анализу, поскольку планировалось их тестирование на животных моделях, и было обнаружено, что они существуют в самых различных олигомерных состояниях, но преимущественно в состоянии димера. Такие же результаты наблюдались и в случае гель-фильтрационного анализа других конструкций, мы это связываем с гидрофобной природой самого пептида и олигомеризацией данных конструкций за счет его гомо-взаимодействия. И последнее замечание по поводу накопления в почках. Я уже отвечала на данный вопрос. Ответ следующий. Размер данной конструкции неоптимальный, и она очень быстро выводится через почки. Время детекции составило 3 часа. Обычно, исходя из литературных данных на сегодняшний момент по тестированию этого пептида, анализируется накопление исследуемого белка через 24 часа, и видно также его основное накопление в почках, что является обычным для небольших белковых конструкций. Собственно, по поводу опечаток, искренне сожалею, учту это в дальнейшей работе.

Мирошников А.И.: Спасибо. Пожалуйста, Владимир Александрович.

Олейников В.А.: По объективным причинам у нас оппонент один отсутствует. Оппонент официальный — это доктор химических наук Пометун Анастасия Александровна. Опять же, отзыв официального оппонента у меня в руках (*излагает отзыв, отзыв положительный*). Отзыв полностью положительный, ну и по стандартному, так сказать. Соответственно, актуальность описывается, я просто цитирую: «В ходе выполнения исследований были впервые изучены вопросы совместимости рНЛIP-технологии в сочетании с высокомолекулярными белковыми компонентами для дальнейшей разработки новых таргетных противоопухолевых диагностических или тераностических агентов.» Новизна, опять же подчеркивается новизна, полученные результаты позволяют заполнить пробелы, как в понимании верных стратегий дизайна гибридных конструкций на основе белков и пептидов рНЛIP, так и оптимальных стратегий их применения для направленного воздействия на раковые клетки. Так, исследования выполнены с использованием современных методов и оборудования. Результаты, полученные в соответствии с поставленными задачами, описаны точно и подробно. Это по поводу степени достоверности результата. Диссертация. Классическая структура, 244 источника. Обосновано введение, актуальность исследования, научная новизна, обозначены цели. В разделе «Литературный обзор» отражены основные аспекты, направленные на понимание причин и механизмов закисления опухоли ее вне клеточного пространства. «Материалы

и методы». Подробно описаны методики. Раздел «результаты и их обсуждения». Шесть основных частей. Ну, об этом мы сегодня как раз очень подробно слышали. Заключение, выводы. Ну и, наконец, вопросы и замечания. Рассматриваемая диссертация производит очень хорошее впечатление. Вместе с тем можно сделать ряд замечаний. Первое. В разделе 2.5 обзора литературы содержится информация о структуре и других особенностях различных пептидов pHLP. Для более полного восприятия этой информации было бы удобно, чтобы она была представлена в виде таблиц. Второе. Некоторые рисунки, например, 4 на странице 21 содержит английские надписи. На мой взгляд, стоит делать перевод подписи к рисунку в тексте диссертации. Третье. Работа содержит некоторое количество опечаток и неточностей. Четвертое. Остается неясным, чем был обусловлен выбор опухолевых клеточных линий, на которых проводили проверку полученных белковых конструкций. Пятое. В разделе 4.4.1 дизайн конструкции на основе mCherry и пептидов pHLP указано, что в работе использовались линкерные последовательности в качестве гибкого жесткого линкера соответственно. Чем была обусловлена именно такая последовательность линкеров? Известно, что иногда в составе гибридных ферментов используются линкерные последовательности, содержащие остатки пролина. Можно ли для пептидов и белков в данной работе использовать остатки пролинов в составе жесткого линкера? Ну и, наконец, заключение. Диссертация Фроловой Анастасии Юрьевны является законченной научно-квалификационной работой, в которой научная новизна и практическая значимость соответствуют требованиям предъявляемой кандидатской диссертации. Диссертационная работа соответствует критериям, установленным положением о присуждении ученых степеней. Сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоение искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9-Биоорганическая химия. Ну, и повторяю, что это доктор, подписано доктором химических наук, заведующей лабораторией молекулярной инженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Пометун Анастасия Александровна.

Мирошников А.И.: Спасибо. Ну, отвечайте, Анастасия.

Фролова А.Ю.: Я полностью согласна с замечаниями оппонента, сделанными по тексту диссертации, я их учту. Далее замечания по работе. По поводу выбора опухолевых клеточных линий. На самом деле нам было проведено тестирование нескольких клеточных линий, имеющихся в лаборатории, поскольку эксперименты по изучению pH-чувствительности требовали значительного понижения pH. Не все клеточные линии были стабильны в особо кислых условиях. Мы выбрали несколько клеточных линий, но эксперименты для диссертации выполняли на одной, которая более удобна в культивировании – это клеточная линия HeLa. Далее вопрос, связанный с размерами линкера. Собственно, я уже отвечала на аналогичный вопрос. Единственное, что хочу дополнить, это вопрос по поводу, можно ли использовать в данной работе остатки пролина в качестве линкера. Я думаю, что есть смысл попробовать получить конструкцию с линкером данного типа, изучить его свойства и дальше сделать выводы о эффективности и целесообразности его применения.

Мирошников А.И.: Настя, вы не уходите сейчас. Кто желает выступить по диссертационной работе? Ну, я не вижу желающих. Тогда давайте заключительное слово свое.

Фролова А.Ю.: Я хотела бы выразить огромную благодарность лаборатории, в которой я работала, которая меня воспитала, в частности, Владимиру Ивановичу Мартынову за руководство работой, за определение направления работы и за предоставление достаточных степеней свобод для реализации личных вопросов, которые вызывали личное любопытство в работе. Также Пахомову Алексею Александровичу за его равнодушие и помощь в любых ситуациях; Анне Пайзеновне Богачук, несмотря на то, что она не относится к нашей лаборатории, мы считаем ее родной, за ее тепло; сотрудникам лаборатории белков гормональной регуляции за их помощь, советы. Особенно хочется поблагодарить сотрудников и руководителя лаборатории молекулярной иммунологии, потому что без их ресурсов не случилось бы данной работы. Но здесь важны не только ресурсы, а и личные качества. Сергей Михайлович Деев и Галина Михайловна Прошкина никогда не оставили меня в беде, в тех ситуациях, в которых требовался их совет или не требовался их совет, они всегда старались помочь и помогали. А также благодарю свою семью близких. Спасибо.

Мирошников А.И.: Спасибо. Ну что, коллеги, голосуем? Давайте проголосуем.

(Идет тайное голосование.)

Олейников В.А.: Уважаемые члены диссертационного совета, Счетная комиссия завершила свою работу. Фролова Анастасия Юрьевна. Роздано бюллетеней 20. Оказалось в урне бюллетеней 20. «За» 20, «против» и недействительных нет.

Мирошников А.И.: Поздравляем, коллеги, с успешной защитой. Последнее, значит, проект заключения диссертационного совета. Есть ли замечания? *(Принципиальных замечаний не было высказано. Заключение принято единогласно).*

Мирошников А.И.: Коллеги, значит, следующее у нас заседание 4 декабря, через недельку еще встретимся. Спасибо.

Председатель
диссертационного совета

Ученый секретарь
диссертационного совета



академик РАН Мирошников А.И.

д.ф.-м.н. Олейников В.А.