

## ОТЗЫВ

официального оппонента  
на диссертационную работу Фроловой Анастасии Юрьевны  
«Мультифункциональные гибридные структуры  
для тераностики раковых заболеваний»,  
представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук  
по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия»

**Актуальность.** Диссертационная работа Фроловой Анастасии Юрьевны посвящена разработке подходов к получению биотехнологических адресных терапевтических препаратов для терапии опухолевых заболеваний. На сегодняшний день проблема онкологических заболеваний далека от окончательного решения. Такие методы как химио- и радио- терапия достигли пределов своих возможностей и основные прорывы были сделаны в области биотехнологии. Среди таких успехов можно отметить иммунотерапию с использованием чек-пойнт ингибиторов, CAR-T терапию а также использование онколитических вирусов. Становится очевидным, что смещение вектора разработки в сторону биотехнологических препаратов становится все более явным, и с этой точки зрения работа Фроловой А. Ю. несомненно является актуальной и важной.

**Новизна и практическая значимость.** Стоит отметить, что сам pHLP пептид давно известен, и не раз применялся в качестве средства доставки липосом, магнитных наночастиц и полимерных мицелл в опухолевую ткань, где наблюдаются пониженные значения pH. При всем при этом не были достаточно подробно изучено влияние слияния пептида pHLP с другим функциональным белком, например способным к флуоресценции или генерации активных форм кислорода. В работе Фроловой А.Ю. убедительно показано влияние длины линкера на функциональные свойства белка слияния, а также показана важность правильного выбора последовательности самого пептида pHLP. Убедительно показано, что понижение значения pH приводит к увеличенному захвату белковых конструкций клетками опухолевой линии HeLa. При этом увеличение связывания белковых конструкций, несущих фотоактивный белок miniSOG и pHLP, с клетками приводит и к увеличению токсичности при облучении светом. Эксперименты на животных показали, что внутривенное введение конструкций, несущих pH чувствительные пептиды и флуоресцентный белок, показывают увеличенное накопление а опухоли по сравнению со свободным флуоресцентным белком.

**Общая характеристика работы.** Диссертация Фроловой А. Ю. изложена 123 страницах. Диссертация написана по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 244 источника, и приложения. При выполнении работы

использовались современные методы молекулярной и клеточной биологии, были проведены эксперименты и использованием животных. Захват и взаимодействие белковых конструкций подтверждалось методами конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Функциональная активность белковых конструкций, несущих фотоактивный белок miniSOG и pHLLIP подтверждена как с использованием специфических АФК красителей в кювете, так и по анализу выживаемости клеток при воздействии света.

### Вопросы и замечания

При этом работа не лишена ряда недостатков:

- 1) Из текста диссертации и автореферата не ясно, каким образом подтверждалась первичная структура белка, после наработки в штамме *E. Coli*. Было ли проведено секвенирование генов после вставки в плазмиду?
- 2) Не совсем ясна логика перехода от короткого линкера -GS- и более длинного -IEGRCGS- использованных в работе с EGFP к линкерам, использованных для работы с mCherry. Здесь одновременно менялись два параметра: 1) линкер и 2) белок и не совсем ясно какие выводы можно сделать из данной части работы.
- 3) В случае белка EGFP наблюдается S образная кривая зависимости эффективности интернализации для белково-пептидных конструкций EGFP-pHLLIP. Для белково-пептидных конструкций mCherry-ATRAM и mCherry-pHLLIP наблюдается явные максимумы на кривых зависимостей от pH. С чем может быть связано такое изменение поведения?
- 4) Не совсем верным кажется утверждение, что эффективность встраивания pH чувствительного пептида зависит от гибкости линкера. С одной стороны наблюдается тенденция к увеличению связывания от длины линкера -GS-<-IEGRCGS-. В свою очередь -SGLRSRAE- < -GASEEGEEGIEGRCGS-. С другой стороны утверждается, что ограничение гибкости не позволяет pH чувствительному пептиду связываться с белковой компонентой и увеличивает его способность интернализироваться. По такой логике -GASEEGEEGIEGRCGS- линкер должен показывать самые плохие результаты.
- 5) Последняя фраза перед Заключением выглядит следующим образом: «Таким образом, показано, что получение pH-чувствительных конструкций на основе белков и пептидов pHLLIP, обладающих высокой эффективностью pH-зависимого связывания является нетривиальной задачей, поскольку данное свойство может зависеть от межмолекулярного взаимодействия белкового компонента с pH-чувствительного пептидом, которое зачастую является неочевидным». Диссертантом получен большой

массив данных, из которого сделаны важные выводы, которые перечислены в  
Заключении и Выводах. Не совсем ясен смысл этого абзаца.

6) П.4.4.4. представляет результаты исследования олигомеризации гибридных  
конструкций. Однако никак не объясняется какой смысл имеет этот опыт, чем он  
важен для диссертации, хороша или плоха эта олигомеризация?

7) Не совсем ясно, почему не представлены данные по накоплению конструкций в  
почках после в/в введения, если это орган с преимущественным накоплением.  
Объяснение, что белок фильтруется через почки не совсем корректно, так как в норме  
количество белка в моче крайне незначительно.

8) В диссертации присутствуют опечатки:

-«4.4.3. Изучение эффективность рН-зависимого связывания гибридных конструкций»

-Рисунок 26а mCherry

Тем не менее указанные недостатки не умаляют качества представленной работы.

### Заключение

Диссертационная работа Фроловой Анастасии Юрьевны «Мультифункциональные  
гибридные структуры для тераностики раковых заболеваний» соответствует критериям, (в  
том числе п. 9), 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; 29.05.2017 г. № 650;  
20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 № 1690; 26.01.2023 №101), а сам  
диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических  
наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия».

Официальный оппонент:

Доцент кафедры медицинских нанобиотехнологий МБФ  
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России  
(Пироговский Университет)  
кандидат химических наук  
Абакумов Максим Артемович  
117513, Москва,  
ул. Островитянова, д. 1.  
Тел. +7 (495) 434-03-29. E-mail: abakumov1988@gmail.com

Подпись к.х.н. Абакумова М.А.  
«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГАОУ ВО РНИМУ  
им. Н. И. Пирогова Минздрава России  
(Пироговский университет)  
к.м.н., доцент, Демина О.М.

