

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.150.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ И
ГОРЕНИЯ ИМ. В. В. ВОЕВОДСКОГО СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 16.10.2024, № 18

О присуждении Овчеренко Сергею Сергеевичу, гражданину Российской Федерации, учёной степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация *«Динамика проникновения белка RL2 в клетки человека и открытия – закрытия пар оснований ДНК, содержащих 8-оксогуанин, по данным методов магнитного резонанса»* в виде рукописи по специальности 1.3.17 – «химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества» принята к защите 16 июля 2024 г., протокол № 17, диссертационным советом 24.1.150.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН), Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, д. 3, приказ о создании диссертационного совета № 1511/нк-от 25.11.2016 года.

Соискатель, *Овчеренко Сергей Сергеевич*, 1996 года рождения, на момент защиты диссертации работает в должности младшего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН).

Диссертация выполнена в лаборатории магнитной радиоспектроскопии НИОХ СО РАН.

Научный руководитель – кандидат химических наук **Шернюков Андрей Владимирович**, старший научный сотрудник лаборатории магнитной радиоспектроскопии НИОХ СО РАН

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук **Усачев Константин Сергеевич**, заведующий лабораторией структурного анализа биомакромолекул Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» (ФИЦ КазНЦ РАН), г. Казань;

кандидат физико-математических наук **Уваров Михаил Николаевич**, старший научный сотрудник лаборатории химии и физики свободных радикалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН), г. Новосибирск – дали **положительные отзывы** на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук (МТЦ СО РАН), г. Новосибирск, в своём **положительном заключении**, подписанном доктором физико-математических наук, ведущим научным сотрудником лаборатории ЭПР спектроскопии МТЦ СО РАН **Вебером Сергеем Леонидовичем**, утверждённом директором МТЦ СО РАН, профессором РАН, доктором физико-математических наук **Фединым Матвеем Владимировичем**, указала, что данная диссертационная работа удовлетворяет требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в действующей редакции), а её автор, Овчеренко С.С., заслуживает присвоения ему искомой учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 – «химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества».

В положительном заключении ведущей организации имеются следующие замечания и вопросы:

1) В тексте диссертации, как правило, используются англоязычные аббревиатуры, в том числе для метода импульсной спектроскопии ЭПР, разработанного в ИХКГ СО РАН. Текст диссертации мог выглядеть более лаконично при использовании русскоязычных аббревиатур в тех случаях, где это возможно.

2) Описывая модифицированный протокол CLEANEX-PM, автор указывает на включение в протокол блока последовательностей, позволяющего «учесть компенсацию неравного нагрева образца за счет разной длительности спин-лока, что позволило улучшить качество извлекаемых данных» (стр. 87 диссертационной работы). О каких характерных величинах температурного нагрева образца идет речь? Что является наиболее критичным следствием изменения температуры образца в процессе эксперимента: изменение заселенности спиновых уровней, различия во временах спиновой релаксации, возникающие неоднородности магнитного поля B_0 , вызванные изменением температуры образца, или что-то ещё?

3) На рисунке 2.22 представлена кинетика интегральной интенсивности спектров ЭПР для образцов клеток A549 после их инкубации в культуральной среде с sRL2. Какой процесс пробоподготовки принимается за нулевую точку отсчета времени? Почему запись кинетики начинается только спустя один час? Можно ли как-то модифицировать процесс пробоподготовки с целью сокращения этого времени? На кинетике, представленной на рисунке 2.22 (А), отчетливо наблюдается смена угла наклона кривых после 11 часов эксперимента. Чем вызвана данная особенность?

На момент утверждения данного заключения соискатель имеет 7 научных работ (из них 3 по теме диссертации), опубликованных в отечественных и международных рецензируемых научных изданиях,

входящих в список ВАК. Личный вклад соискателя в опубликованные работы составляет примерно 80%.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Structural and aggregation features of a human κ -casein fragment with antitumor and cell-penetrating properties / O.A. Chinak, A.V. Shernyukov, **S.S. Ovcherenko**, E.A. Sviridov, V.M. Golyshev, A.S. Fomin, I.A. Pyshnaya, E.V. Kuligina, V.A. Richter, E.G. Bagryanskaya // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, № 16. – P. 2919.
2. Uptake of cell-penetrating peptide RL2 by human lung cancer cells: monitoring by electron paramagnetic resonance and confocal laser scanning microscopy / **S.S. Ovcherenko**, O.A. Chinak, A.V. Chechushkov, S.A. Dobrynin, I.A. Kirilyuk, O.A. Krumkacheva, V.A. Richter, E.G. Bagryanskaya // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 18. – P. 5442.
3. Dynamics of 8-oxoguanine in DNA: decisive effects of base pairing and nucleotide context / **S.S. Ovcherenko**, A.V. Shernyukov, D.M. Nasonov, A.V. Endutkin, D.O. Zharkov, E.G. Bagryanskaya // *Journal of the American Chemical Society* – 2023. – Vol. 145, № 10. – P. 5613-5617.

На автореферат диссертации поступило 3 отзыва. Все отзывы положительные и не содержат замечаний. Отзывы поступили от:

- доктора физико-математических наук **Ходова Ильи Анатольевича**, заведующего лабораторией научно-исследовательского отдела №1 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук, г. Иваново;
- доктора химических наук **Польшакова Владимира Ивановича**, ведущего научного сотрудника лаборатории магнитной томографии и спектроскопии Факультета фундаментальной медицины

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», г. Москва;

- кандидата физико-математических наук **Суханова Андрея Анатольевича**, старшего научного сотрудника лаборатории спиновой химии и спиновой физики Казанского физико-технического института им. Е.К. Завойского – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань.

В **положительных отзывах** оппонентов имеются следующие замечания, вопросы и пожелания:

Усачев К.С.: (1) Для выяснения деталей взаимодействия RL2 с белком-мишенью ТОМ70 можно было ввести парамагнитную метку в белок ТОМ70 и проанализировать методом ЭПР расстояния для комплекса с меченым парамагнитной меткой белком RL2-MTSL; (2) В аминокислотной последовательности на С-конце белка RL2 указано наличие полигистидинового тага, что может влиять на функциональные свойства белка. Почему не был использован рекомбинантный белок RL2 с отщепляемым протеазой гис-тагом на N-конце? (3) В разделе 2.4.5. не хватает указания, какие именно могут существовать альтернативные эндоцитозу пути проникновения RL2 в клетки человека. (4) На некоторых рисунках используются англоязычные подписи, которые стоило перевести на русский язык.

Уваров М.Н.: (1) Одной из задач работы было поставлено «Получить кривые плавления исследуемых дуплексов ДНК <...>» (стр. 10). Понятие «Кривые плавления» является неоднозначным, поэтому следует сформулировать эту исследовательскую задачу другими словами, избегая таких слов. (2) В обсуждении полученных спектров ЭПР спин-меченного белка RL2 в культуральной среде DMEM, утверждается, что «белок почти

полностью переходит в агрегированное состояние» (стр. 73), однако, не указываются параметры спектров, достоверно соответствующих ЭПР-спектру агрегата. Таким образом, в работе не хватает обсуждения о том, почему белок RL2 проникает в клетку в виде агрегатов. (3) К сожалению, в работе не обсуждается проблема воспроизводимости экспериментов по изменению ЭПР-спектров в живых клетках вследствие процессов метаболизма. В частности, не ясно, насколько воспроизводимы кинетики, представленные на рис. 2.22, и какова природа излома кинетики на рис. 2.22 А.

Во всех отзывах отдельно отмечается, что указанные замечания являются несущественными, не затрагивают основных положений, защищаемых автором, и не снижают ценности проведенного исследования и научной и практической значимости диссертационной работы. Все отзывы заканчиваются выводом о том, что диссертационная работа Овчеренко С.С. *полностью соответствует* требованиям, которые ВАК предъявляет к кандидатским диссертациям, а её автор – Овчеренко С.С. – заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 «химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества».

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается компетентностью оппонентов и сотрудников ведущей организации в области применения методов ядерного магнитного резонанса и электронного парамагнитного резонанса, что подтверждается наличием у них публикаций ряда научных работ в данной области исследований, в том числе соответствующих тематике диссертационного исследования соискателя и опубликованных в ведущих российских и международных журналах и изданиях.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

По данным многомерной спектроскопии ЯМР установлено, что RL2 является внутренне неупорядоченным белком. Мономерная форма белка включает N-концевой участок (1-43 а.о.), который по данным ^{15}N релаксационных экспериментов ЯМР является наиболее упорядоченным. В участке на N-конце (1–63 а.о.) наблюдается остаточная третичная структура.

Установлено, что в растворе RL2 образует водорастворимые агрегаты, количество которых зависит от кислотности среды. Димеры RL2 образуют агрегаты в культуральной среде, которые, проникая в живые опухолевые клетки аденокарциномы легких человека A549, распадаются на отдельные белковые молекулы.

Разработан протокол ЯМР с адаптацией CLEANEX-PM, позволяющий измерять константы скорости обмена иминопротонов ДНК с протонами воды. Установлено, что основание 8-оксогуанин на 3 – 4 порядка оказывается более доступным во внеспиральном положении в ДНК, когда оно напротив аденина по сравнению с тем, когда 8-оксогуанин напротив цитозина. При этом, будучи напротив цитозина, доступность 8-оксогуанина во внеспиральном положении в ДНК оказывается меньше доступности гуанина во внеспиральном положении, когда гуанин напротив цитозина.

Установлено, что дестабилизирующий эффект наличия пары 8-оксогуанин – цитозин в дуплексах ДНК не происходит на уровне индивидуальной пары оснований, а является следствием изменения стабильности пар оснований соседних с парой 8-оксогуанин – цитозин.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что полученная информация об особенностях строения и организации RL2 в растворе, а также по установлению способа проникновения RL2 в клетки аденокарциномы легких человека A549, является важной для понимания функций белка RL2 и может быть взята за основу для улучшения его противоопухолевых свойств. Установленные значения кинетических

параметров процесса открытия – закрытия пар оснований ДНК, содержащих 8-оксогуанин, имеют существенное значение для понимания механизмов раннего распознавания 8-оксогуанина гликозилазами ДНК: Пара 8-оксогуанин-цитозин открывается не легче, чем нормальная пара гуанин-цитозин, что указывает на более вероятный механизм распознавания 8-оксогуанина формамидопиримидин-ДНК-гликозилазой и 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой, при котором они способствуют принудительному открытию пары для захвата повреждения; В случае пары 8-оксогуанин-аденин повреждение 8-оксогуанин оказывается на несколько порядков более доступным во внеспиральном положении, что может способствовать распознаванию 8-оксогуанина MutY-ДНК-гликозилазами.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики заключается в том, что результаты диссертационной работы могут лечь в основу разработки новых противоопухолевых препаратов на основе неупорядоченных белков, а также в улучшения современных методов доставки терапевтических молекул внутрь клеток человека. Разработанные методы и подходы проведения экспериментов ЭПР и ЯМР, включая протокол с адаптацией CLEANEX-PM, могут применяться для изучения свойств различных биомолекул и их взаимодействий в живых системах.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что: *сделанные выводы и полученные научные результаты* основаны на применении современных экспериментальных методов и теоретических подходов; проведены тщательные экспериментальные измерения, полученные результаты согласуются с известной совокупностью экспериментальных данных.

Личный вклад соискателя состоит в планировании и проведении экспериментов, обработке экспериментальных данных, обсуждении результатов и их оформлении для публикации в рецензируемых журналах. Весь экспериментальный материал по ЭПР и ЯМР спектроскопии был

получен и обработан непосредственно автором или непосредственно с его участием. Протокол с адаптацией CLEANEX-PM был разработан автором совместно с научным руководителем.

Диссертация выполнена на высоком научном уровне и представляет собой законченное исследование с актуальными задачами и содержательными, фундаментальными и практически важными результатами. Материалы диссертации соответствуют требованиям специальности 1.3.17 (п. 1 «химическая и спиновая динамика элементарных процессов, экспериментальные методы исследования химической структуры и динамики химических превращений», п. 5 «химические механизмы реакций и управление реакционной способностью, спиновая динамика и спиновая химия, экспериментальные методы исследования химической, энергетической и спиновой динамики»). Соискатель Овчеренко С.С. успешно ответил на все задаваемые ему в ходе заседания вопросы из зала, на замечания оппонентов, ведущей организации и в отзывах на автореферат. Соискатель согласился со всеми техническими замечаниями и пожеланиями, по научным вопросам были даны аргументированные и четкие ответы.

На заседании *16 октября 2024 г.* диссертационный совет постановил: за решение научной задачи определения методами магнитного резонанса особенностей структуры и организации белка RL2 в растворе и в живых клетках человека, а также параметров динамики открытия-закрытия пар оснований ДНК, содержащих повреждение 8-оксогуанин, присудить ***Овчеренко Сергею Сергеевичу*** учёную степень кандидата физико-математических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 13 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании и голосовании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение

учёной степени – 19, против присуждения учёной степени – 0,
недействительных бюллетеней – 0.

Председатель диссертационного совета,

д-р хим. наук, доцент

Онищук Андрей Александрович

Ученый секретарь диссертационного совета,

канд. хим. наук

Поздняков Иван Павлович



«18» октября 2024 г.