



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**  
*им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова*  
Российской академии наук  
( ИБХ РАН )

---

## СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01  
при ИБХ РАН

2 марта 2016 года

Защита диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук **Пантелеева Павла Валерьевича** на тему:

«Структурно-функциональное исследование антимикробных пептидов животного происхождения»

по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Москва – 2016

## СТЕНОГРАММА

заседания 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 от 2 марта 2016 года.

Председатель диссертационного совета  
Академик РАН

Иванов В.Т.

Ученый секретарь диссертационного совета  
Доктор физико-математических наук

Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 6.

1.	Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2.	Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
3.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
4.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
5.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
6.	Член-корр. РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
7.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
8.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
9.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
10.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
11.	Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
12.	Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
13.	Д.х.н.	Молотковский Юлиан Георгиевич	(02.00.10)
14.	Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
15.	Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
16.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
17.	Академик РАН	Свердлов Евгений Давидович	(03.01.03)
18.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
19.	Д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
20.	Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
21.	Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)

### **Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Защита кандидатской диссертации Пантелеевым Павлом Валерьевичем.

### **Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:**

(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя. Отмечает, что объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя и все необходимые документы в деле есть).

### **Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Есть ли необходимость дополнять, менять, исправлять? Нет необходимости. А вот теперь, Павел Валерьевич – вам слово. На доклад – двадцать минут.

**Пантелеев П.В.**

(Излагает основные положения диссертационной работы.)

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Спасибо за доклад, переходим к обсуждению. У кого есть желание задать вопросы? Николай Владимирович, потом Шпаковский.

**Д.х.н. Бовин Н.В.:**

Уточните, пожалуйста: пептидные антибиотики этого класса предполагается использовать системно? То есть это пероральное применение? И если да, то тогда у меня возникает некоторое смущение по поводу вашей борьбы за гидрофильность: обычно, при системном применении для увеличения биодоступности стараются, наоборот, сделать молекулы более гидрофобными. Объясните, пожалуйста.

**Пантелеев П.В.:**

Да, спасибо за вопрос. Здесь сразу стоит отметить, что вопрос способа применения – самый актуальный. Конечно, преимущественным вариантом на данном этапе развития этой работы, и в целом для антимикробных пептидов, является наружное применение. О системном применении пока речь не идет, поскольку для них не удастся достигнуть оптимальных фармакокинетических показателей и параметров токсичности. В целом, все, что Вы сказали – это, безусловно, верно. И, если мы говорим об их использовании, то в любом случае необходимо любым способом преодолеть цитотоксический эффект. И наша задача, в первую очередь, избавиться от него, а потом уже думать как препарат будет применяться, как мы можем его дополнительно модифицировать, чтобы изменить его биодоступность и другие свойства.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Шпаковский.

**Д.б.н. Шпаковский Г.В.:**

Вы сказали, что одной из главных проблем является отсутствие новых антибиотиков, действующих на грамположительные бактерии, да?

**Пантелеев П.В.:**

Как раз действующих в отношении грамположительных бактерий – много, и они активно разрабатываются, а для грамотрицательных – мало.

**Д.б.н. Шпаковский Г.В.:**

Понятно. Исходя из ваших экспериментальных данных и данных литературы, какие из групп антибиотиков, которые были изучены, кажутся вам наиболее перспективными?

**Пантелеев П.В.:**

Которые будут активны в отношении каких штаммов?

**Д.б.н. Шпаковский Г.В.:**

В отношении грамотрицательных.

**Пантелеев П.В.:**

На данный момент рассматривается возможность возобновления активного использования полимиксинов, но для них как раз самой обсуждаемой проблемой является высокая токсичность, а именно нефро- и нейротоксичность. Показатели острой токсичности для них весьма существенны. Если сравнить, то острая токсичность для полимиксина В составляет 4 мг/кг при внутривенном введении, а для антимикробных пептидов животных и их аналогов, которые мы получаем, этот параметр составляет около 40 мг/кг. Десять раз – это значительный сдвиг терапевтического индекса. Полимиксины на настоящий момент являются антибиотиком «последней надежды» для большинства пациентов. Но стоит отметить, что в отношении полимиксина уже появляются случаи резистентности. Статистика по России свидетельствует, что каждый

двадцатый клинический изолят резистентен к полимиксину. Также есть статистика по всему миру, и она соотносится с этими данными.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Лейтмотив вашей работы – это такая сверхзадача: максимизировать противомикробную активность и минимизировать цитотоксичность, токсичность по отношению к пациенту, человеку. Чтобы добиться этой цели крайне желательно понять принцип действия антибиотика. Поскольку он, скорее всего, действует на уровне мембраны, нужно искать различия в мембранном взаимодействии с клеткой-хозяином и с микроорганизмом. На чем вы планируете максимально сконцентрироваться: взаимодействие с липидной частью мембраны, белковой частью мембраны, либо с какими-то другими принципами различия цитотоксичности и антимикробного действия?

**Пантелеев П.В.:**

Если говорить о конкретных мишенях, то белки не являются мишенями для антимикробных пептидов. Основная мишень для них в случае грамотрицательных бактерий – это липополисахарид, для грамположительных – липотейхоевые кислоты. Далее – липидный состав. То есть мы смотрим на взаимодействия с этими компонентами. В данной работе исследовался параметр агрегации: мы его выявили и поняли, что это, действительно важный момент. Ареницин, агрегируя, меняет свои свойства. Он становится более гидрофобным, более склонным к димеризации, у него более выраженная амфифильная структура. Если мы этот процесс нарушим, то резко повысим его терапевтический индекс. И здесь всегда нужно отталкиваться от конкретного пептида. Мы знаем его механизм действия, мы нарушили определенный процесс, и теперь мы можем сказать, что есть лидирующее соединения, и с ними можно дальше работать, модифицировать их и улучшать определенные терапевтические свойства.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Я согласен, что каждый пептид может иметь свой конкретный механизм действия. Но, тем не менее, хотелось бы увидеть и понять ваше представление о том, где максимальная возможность использовать различия в эукариотах и прокариотах.

**Пантелеев П.В.:**

Да, спасибо. В первую очередь – это липидный состав. Мембрана грамположительной бактерии обогащена фосфатидилглицерином и кардиолипином. Такого не наблюдается в нормальных клетках, поскольку данные липиды не экспонированы на поверхность. Это основные и ключевые мишени. Липополисахарид – это также важный паттерн, на который можно действовать. У тахиплезина к нему высокая природная аффинность, которая приближается к аффинности полимиксинов. Если говорить более детально, также оказывает влияние параметр спонтанной кривизны поверхности мембраны. Это более сложные процессы, они пока что мало изучены: то есть, как механизм действия пептида связан с кривизной поверхности мембраны. Для некоторых пептидов показано, что появление локальных зон с отрицательной спонтанной кривизной поверхности у грамотрицательных бактерий способствует олигомеризации пептида и, тем самым, объясняется специфичность в отношении мембран с определенным составом. Здесь не все так просто, и необходимо подойти к конкретной мишени и понять, что и как там работает, и какие факторы влияют.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

С этим я согласен. Спасибо. У кого еще есть вопросы? Прошу.

**Д.б.н. Долгих Д.А.:**

Некоторые из ваших пептидов содержат довольно много S-S связей. В процессе выделения вы как-то контролировали, что они завязываются правильно? Что-то делали для этого?

**Пантелеев П.В.:**

Да, конечно. Если вы заметили, речь шла о том, что даже в оптимизированной технологии мы использовали тельца включения для получения пептида. И, естественно, в первую очередь, нас озадачил вопрос: все ли там правильно сворачивается? Мы выделили и посмотрели: проблем никаких не было. У нас есть данные трипсинолиза и масс-спектрометрии, которые подтверждают, что они сворачиваются правильно. Другой вопрос, почему это происходит. И это сложный вопрос, и нас самим это пока не совсем понятно. Тиоредоксин – это белок, который, наоборот, повышает растворимость, в том числе, антимикробных пептидов. Но есть ряд исключений, например, бета-шпилечные пептиды. Это показано с ареницином и с тахиплезином. Есть предположения, но они носят пока спекулятивный характер, и для них нет подтверждений.

**Д.б.н. Долгих Д.А.:**

А межмолекулярные? Не могут какие-либо группы взаимодействовать?

**Пантелеев П.В.:**

В любом случае это агрегаты, это большие структуры.

**Д.б.н. Долгих Д.А.:**

А небольшие ассоциаты?

**Пантелеев П.В.:**

Мы подробно этот вопрос не изучали. На данном этапе можно сказать, что после солюбилизации телец включения и их расщепления получается целевой продукт. Структура бета-шпилечных пептидов настолько стабильна, что дисульфидная связь может возникать как вторичный фактор после образования водородных связей. Они уже могут быть в виде сформированных бета-шпилек в клетке после синтеза, несмотря на восстановительную среду в *Escherichia coli*, а замыкание дисульфидных связей может происходить под действием каких-либо факторов после разрушения клетки или в процессе выделения.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Прошу.

**Д.х.н. Шуваева Т.М.:**

Не могли бы вы сказать в каких животных были найдены эти антимикробные пептиды, потому что так понятно, что цитотоксичность будет характерна для других хозяев. А в противном случае, если есть подходящие животные, то это готовый ветеринарный препарат.

**Пантелеев П.В.:**

Да, конечно. По поводу животных: почти во всех классах животных были найдены подобные молекулы.

**Д.х.н. Шуваева Т.М.:**

А как же там с цитотоксичностью?

**Пантелеев П.В.:**

Есть очень характерный пример. Есть среди бета-шпилечных пептидов есть так называемые протегрины – молекулы, которые выделены из лейкоцитов свиньи. И они по своим свойствам очень похожи на ареницины. У них аналогичный механизм действия: формирование тороидальной поры, нарушение структуры мембраны. Тем не менее, они не токсичны в отношении эритроцитов свиньи, поскольку у мембран

эритроцитов свиньи липидный состав отличный от такового для человеческих. У них есть обогащение по сфингомиелину, у эритроцитов человека есть обогащение по фосфатидилхолину. И, соответственно, здесь меняется их активность.

**Д.х.н. Шуваева Т.М.:**

Я про это и говорю.

**Пантелеев П.В.:**

Понятно. По-видимому, они и так прекрасно справляются. У них арсенал пептидов очень богатый.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Прошу. Ефремов.

**Д.физ.-мат.н. Ефремов Р.Г.:**

Скажите, пожалуйста, один из выводов вашей работы заключается в том, что механизм гемолитического действия антимикробных пептидов определяется степенью их димеризации.

**Пантелеев П.В.:**

Конкретно мы исследовали ареницин.

**Д.физ.-мат.н. Ефремов Р.Г.:**

Да, ареницин. Вопрос: вы уверены в специфичности, в селективности этой димеризации? Или это просто олигомеризация, какая-то агрегация и так далее? На одном из слайдов, например, было показано, что вы контролировали степень димеризации ареницина, используя спектроскопию КД в мицеллах.

**Пантелеев П.В.:**

Здесь идет речь о качественном понимании.

**Д.физ.-мат.н. Ефремов Р.Г.:**

А как качественно можно с помощью КД-спектроскопии контролировать степень димеризации? Вот это непонятно.

**Пантелеев П.В.:**

Здесь речь идет не о степени димеризации, а о переходе в конкретный тип структуры. То есть об изменении конформации.

**Д.физ.-мат.н. Ефремов Р.Г.:**

Вот у вас на слайде это показано.

**Пантелеев П.В.:**

Зачем мы использовали КД-спектроскопию? Есть спектр, который говорит нам о том, что в растворе присутствует преимущественно мономер. И есть спектр, который говорит о том, что у нас преимущественно димер.

**Д.физ.-мат.н. Ефремов Р.Г.:**

Как вы это разделяете? Вы контролируете вторичную структуру, общее содержание элементов вторичной структуры.

**Пантелеев П.В.:**

Да, я согласен с вами. Это, безусловно, в данном случае эмпирические данные. Мы исходили из структуры, полученной методом ЯМР-спектроскопии. Мы знаем, что в водном растворе, ареницин имеет характерный КД-спектр. Ему соответствует скрученная бета-шпилька. Это показано с помощью ЯМР-спектроскопии. А вот спектр пептида в присутствии мицелл додецилфосфохолина говорит о формировании димера. И это тоже было показано методом ЯМР-спектроскопии для аналога природного пептида. То есть мы можем говорить о качественном изменении от полностью мономерной формы к стабильному димеру. И дальше мы можем смотреть, что происходит для конкретного изучаемого аналога: как он меняет свои свойства.

Например аналог L14R: если для него наблюдается появление такого же характерного КД-спектра, мы можем судить, что он с большой долей вероятности существует в мицеллах также, как и ареницин – в форме димера. Мы провели такой скрининг, посмотрели какие из пептидов меняют свою конформацию. И, действительно, эта информация совпала и коррелирует с той, что мы показали путем скрининга их цитотоксичности. Изменение конформации происходит у тех аналогов, в которых были проведены замены определенных гидрофобных остатков на N-полуцепи на большой и положительно заряженный остаток аргинина. Далее эти изменения были исследованы методом ЯМР-спектроскопии. Было показано, что, действительно, мы можем по КД-спектру качественно судить о том, формируется ли димер или нет. А данные ЯМР нам точно сказали: у нас преимущественно – мономер.

**Д.физ.-мат.н. Ефремов Р.Г.:**

А вторичная структура мономера меняется при предполагаемой димеризации?

**Пантелеев П.В.:**

К сожалению, пока что данных по этой части работы нет. Мы знаем, что это мономер, но как он меняет свою степень скрученности – это вопрос дальнейших исследований.

**Д.физ.-мат.н. Ефремов Р.Г.:**

Если содержание вторичной структуры не меняется при димеризации, тогда вы отследить это по спектрам кругового дихроизма не сможете. И гипотеза о переходе «мономер-димер», ссылаясь на данные ЯМР-спектроскопии – это очень такой рискованный тезис.

**Пантелеев П.В.:**

И, тем не менее, это показательно. Мы фиксируем, что олигомеризация, характерная для ареницина, не происходит у некоторых аналогов. А это очень важный фактор, то есть он меняет свою структуру именно при взаимодействии. Додецилфосфохолин – хорошая имитирующая среда, в которой можно получить полезную информацию: как пептид встраивается, как он взаимодействует с мицеллой.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Еще есть. Прошу.

**к.х.н. Рогожин Е.А.:**

Вы в вашей работе исследовали только антибактериальную активность пептидов. Скажите, а есть ли данные о действии бета-шпилечных антимикробных пептидов на грибные патогены, в частности, на возбудителей кандидозов и аспергиллезов?

**Пантелеев П.В.:**

Да, есть. Для многих представителей бета-шпилечных антимикробных пептидов показана выраженная противогрибковая активность, однако механизм действия не столь изучен. В большинстве случаев это информация, которая выявляется в ходе первичного скрининга антимикробных свойств пептидов. Активность есть, она выраженная. Механизм противогрибкового действия может обуславливаться особенностями состава мембран, который характерен для грибковых фито- и других патогенов. Но, к сожалению, механизмов, столь досконально изученных, нет.

**к.х.н. Рогожин Е.А.:**

Спасибо.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Иссякли вопросы? Похоже, что так. Спасибо, отдохните немного. Переходим к заслушиванию отзывов. Для начала – ведущая организация.

**Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:**

Ведущая организация – Федеральный исследовательский центр «Фундаментальный

центр биотехнологии» Российской академии наук. Отзыв полностью положительный. (Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается.)

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания: 1) Описываемые в разделе «Результаты и обсуждение» исследования были начаты со скринингового сопоставления девяти видов АМП, на основании которого в качестве приоритетных объектов для дальнейших экспериментов были выбраны ареницин-1 и тахиплезин-1. Однако таблица 6 в разделе 4.3, к которой адресуется диссертант, содержит сведения только об антибактериальной активности (величине МИК) сопоставляемых препаратов. В рамках дальнейших работ одной из важных задач было повышение терапевтического индекса АМП посредством конструирования мутантных форм. Однако в рамках диссертации не комментируется, какие величины терапевтических индексов характерны для вариантов АМП, отбракованных на стадии первичного скрининга. 2) При обсуждении экспериментальных данных о свойствах мутантных форм ареницина-1 диссертант в ряде случаев сравнивает их с природным ареницином-1 (стр. 76, 78, 80, 82, 85, 87). Однако текст диссертации не содержит информации о представленном препарате или самостоятельном выделении ареницина-1 из *Arenicola marina*. В связи с этим необходимо уточнить, с какими именно препаратами (или источниками информации) проводились соответствующие сравнения. Отмечается, что данные соображения не снижают общую положительную оценку работы.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Павел Валерьевич, в отзыве были замечания. Можете на них ответить.

**Пантелеев П.В.:**

По поводу первичного скрининга: мы не ставили своей задачей в ходе первичного отбора проводить расчет терапевтических индексов. Для некоторых антимикробных пептидов активность или цитотоксичность были не выраженными, поэтому сопоставление данного параметра было бы не совсем корректным. В ходе дальнейшего скрининга пептидов расчет терапевтических индексов уже имел смысл. Таким образом, в ходе первичного скрининга мы опирались исключительно на данные об антимикробной активности. Если пептид активен и сохраняет свои свойства в условиях, приближенных к физиологическим, то с ним далее проводится работа по снижению цитотоксических свойств. Это кажется наиболее разумным путем. Создать активное соединение *de novo* весьма сложно. Природа сама создала эти соединения, а наша задача – повысить их специфичность. Со вторым замечанием я полностью согласен: в некоторых местах текста диссертации были некорректно употреблены формулировки «природный пептид». Мы, действительно, не работали с природным пептидом, поскольку его содержание в целоμοцитах пескожила незначительно. Работы с природным пептидом были прекращены на начальной стадии работы, а основная работа проводилась с рекомбинантным аналогом, который полностью идентичен природному. Целью использования данной формулировки было сокращение объема фраз, которые употреблялись в тексте диссертации.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Если он полностью идентичный, то почему аналог? Идентичный рекомбинантный пептид, но не аналог. Ладно, это терминология. Спасибо. Татьяна Владимировна, как вы можете охарактеризовать вашего ученика?

**Д.х.н. Овчинникова Т.В.:**

Глубокоуважаемые члены диссертационного совета, Вадим Тихонович, Павел пришел к нам в 2008 году студентом Российского химико-технологического университета им. Д.И.Менделеева. Как уже сказал здесь Николай Каземирович, вот эта химическая база – очень хорошая основа, чтобы далее выстроить свое биологическое образование. И Павел с этим очень хорошо справился. Придя в нашу лабораторию, освоил генно-инженерные методы, методы молекулярного клонирования. Далее поступил к нам в аспирантуру после успешного завершения своей дипломной работы, которую защитил на «отлично». Также успешно завершил работу над диссертацией. Надо сказать, что Павел отличается аналитическим мышлением, умением вдумчиво работать с литературой, хорошим владением иностранным языком. Он хорошо пишет, поэтому не приходилось печально вздыхать, когда мы работали над текстом диссертации и автореферата. Вся работа была сосредоточена на научном обсуждении. Поэтому у Павла очень много публикаций: в результатах диссертации приведены шесть статей, из них четыре в зарубежных журналах. На самом деле, их уже восемь. Еще есть два патента, которые оформлены с участием Павла. В прошлом году он доложил эту работу на двух зарубежных симпозиумах в Австрии и Хорватии, а также на целом ряде научных конференций в нашей стране. Кроме того, как и все другие сотрудники Учебно-научного центра, Павел участвует в педагогической деятельности, ведет занятия со студентами и аспирантами, руководит дипломными работами, магистерскими диссертациями, участвует в проведении дней «открытых дверей» нашего института, в организации молодежных научных школ. Это тоже огромная работа, от которой сотрудников научного центра никто не освобождал. И он делает это с удовольствием, и у него это всегда хорошо получается. Я считаю, что это тоже положительная характеристика его как будущего специалиста нашего института. С 2013 года он работает в должности младшего научного сотрудника Учебно-научного центра. Надо сказать, что Павел обладает еще целым рядом положительных качеств. Он очень много и вдумчиво работает, является зрелым специалистом, который вполне заслуживает искомой степени. Я обращаюсь к диссертационному совету с просьбой поддержать Павла. Спасибо.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Хорошо, мы учтем ваши пожелания. У нас есть отзывы на автореферат. Их три, моему?

**Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:**

Да. В совет поступили три отзыва на автореферат. (Зачитывает отзывы, все отзывы положительные, все отзывы без замечаний, отзывы прилагаются.)

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Я так понимаю, отвечать не на что. Двигаемся дальше. Официальные оппоненты. Евгений Сергеевич Северин болен, поэтому давайте начнем с Вас, Людмила Алексеевна. А потом мы зачитаем отзыв Евгения Сергеевича.

**Д.х.н. Баратова Л.А.:**

Глубокоуважаемый председатель, члены диссертационного совета, коллеги, прежде чем огласить мой отзыв как официального оппонента, мне бы хотелось сказать о том, что на меня произвело сильное впечатление не столько сам доклад диссертанта, как его владение материалом. Это чувствуется сразу. Его умение дискутировать, отвечать на вопросы просто: чувствуется, что это уже сложившийся специалист. Работа, которую мы сегодня слушали, является логическим развитием тех исследований, которые в последние годы проводятся научным коллективом Татьяны Владимировны

Овчинниковой. Сегодня уже речь шла об актуальности данной работы, поэтому я повторяться не буду: это, действительно, очень важно. Мне бы хотелось отметить то, что эта работа, помимо всего прочего, очень интересна, своеобразна и достаточно перспективна. (Зачитывает отзыв. Отзыв положительный, отзыв прилагается). Замечания у меня следующие: 1) В работе корректность замыкания дисульфидных связей в пептидах была доказана путем гидролиза трипсином, с последующим разделением на ОФ-ВЭЖХ и анализом фракций с помощью масс-спектрометрии. Не было бы лишним включить данные результатов этого эксперимента в материалы диссертации. 2) Приведенные в диссертации результаты свидетельствуют об эффективности используемых схем биосинтеза и очистки антимикробных пептидов. При этом автором не обсуждается вопрос масштабирования этих схем для получения перспективных аналогов в препаративных количествах с целью проведения расширенных биологических испытаний. 3) В ходе исследования синергических антибактериальных эффектов автор использует различные пары антимикробных пептидов, моделируя тем самым взаимодействие защитных молекул в природе. На мой взгляд, с целью практического применения также было бы желательно протестировать пары «антимикробный пептид – конвенциональный антибиотик», причем использовать в первую очередь гидрофобные антибиотики и пептиды, доставка которых к внутриклеточным мишеням в клетку затруднена. Это очень незначительные замечания, которые не умаляют значимости работы. Эта работа мне понравилась, поскольку она может быть продолжена в самых разных направлениях. На мой взгляд, наиболее интересным аспектом является исследование механизма цитотоксического действия пептидов. Диссертационная работа Пантелеева Павла Валерьевича является цельным законченным исследованием и соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Павел Валерьевич, были замечания, на которые нужно ответить.

**Пантелеев П.В.:**

Спасибо, Людмила Алексеевна. Первое: о данных триптического гидролиза и корректности замыкания дисульфидных связей. Я исходил из того, что это достаточно рутинный эксперимент, и эти данные приведены в публикациях на тему диссертации. Это было сделано с целью сокращения объема диссертации. Может и стоило включить результаты этих экспериментов в материалы диссертации. Что касается масштабирования технологии получения пептидов, то нам пришлось проводить подобную работу, поскольку в экспериментах *in vivo* используются достаточно большие количества вещества. Разработанные схемы работают весьма эффективно. На данном этапе мы не используем ферментер, однако нам удастся самим получать количества вещества, необходимые для стартовых экспериментов *in vivo*. У нас есть возможность использования соответствующей аппаратуры, которая необходима для проведения масштабирования. И, надеюсь, мы проведем его в дальнейшем. Другой вопрос, что в данной работе был сделан акцент на скрининг, а масштабирование технологии получения рекомбинантных антимикробных пептидов станет предметом новой работы в Учебно-научном центре. Как инженер-биотехнолог по образованию я знаю, что это большая работа с многофакторным экспериментом и оптимизацией. Возможно, предмет отдельной диссертационной работы. Что касается вопроса о тестировании совместного

действия с антибиотиками, то эти исследования также проводятся в рамках работы сотрудников Учебно-научного центра, в частности Ильи Болосова. Есть весьма обнадеживающие результаты, в частности, при совместном использовании антимикробных пептидов и гидрофобных антибиотиков – макролидов. Мы не уходим от этих вопросов, мы занимаемся ими параллельно. Это, действительно, важное замечание, согласен с ним полностью.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Спасибо. Нам нужно зачитать отзыв Евгения Сергеевича.

**Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:**

Второй оппонент – Евгений Сергеевич Северин. (Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается.) Отмечается, что у оппонента нет принципиальных замечаний по научному содержанию работы. Однако стоит отметить ряд небольших замечаний и пожеланий: 1) Для того, чтобы с уверенностью говорить об отсутствии кросс-устойчивости к АМП у мультирезистентных клинических изолятов, было бы желательно провести аналогичные испытания в отношении полимиксин-резистентных изолятов, поскольку данная группа липопептидных антибиотиков наиболее близка по своему механизму действия к мембранотропным АМП. 2) Снижение цитотоксических эффектов для исследуемых аналогов V8R и ALP1, показанных в экспериментах *in vitro*, сохраняется и при тестировании острой токсичности в отношении мышей. На мой взгляд, было бы интересно провести испытания *in vivo* антимикробной активности пептидов, чтобы подтвердить сохранение высокой антибактериальной активности аналогов, продемонстрированное в условиях *in vitro*. 3) В диссертации и автореферате присутствует ряд опечаток и стилистических ошибок. Например, в подписях к рис. 9Б автореферата и рис. 36 диссертации. Высказанные замечания не носят принципиального характера и не снижают общего положительного впечатления от работы Пантелеева П.В., которая в полной мере отвечает требованиям, предъявляемым к диссертационным работам. (Продолжает зачитывать отзыв). Диссертационная работа Пантелеева Павла Валерьевича соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней", а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Павел Валерьевич, еще раз на трибуну, пожалуйста.

**Пантелеев П.В.:**

Благодарю Евгения Сергеевича за работу с диссертацией. По поводу опечаток – полностью согласен. Были допущены досадные опечатки. Наши взгляды на вопрос о полимиксин-резистентных штаммах совпали. Мы искали, в первую очередь, именно изоляты такими свойствами, поскольку полимиксины действуют в схожей с антимикробными пептидами манере. К сожалению или, может быть, к счастью, среди пациентов, из которых были выделены штаммы, полимиксин-резистентных обнаружено не было. Мы будем продолжать данную работу и, надеюсь, эти исследования проведем. На данный момент из литературы известно, что кросс-резистентность в отношении антимикробных пептидов у таких штаммов отсутствует. С замечанием, касающимся исследований *in vivo*, я полностью согласен. Эти испытания могли бы стать дополнительным логическим завершением данной работы, однако на данный момент подобные исследования провести не удалось. Могу лишь сказать, что нам удалось поставить эксперимент, где контролировался процесс заживления ран, обсемененных бактериями, у мышей. Есть очень интересные, положительные результаты, однако ввиду

отсутствия соответствующих контролей и недостатка статистики, о публикации полученных данных речь пока не идет.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Спасибо. У нас завершилась запланированная часть защиты. Переходим к общей дискуссии: кто бы хотел добавить что-либо к тому, что мы слышали? Прошу, Юрий Николаевич.

**Д.х.н. Уткин Ю.Н.:**

Уважаемые коллеги, я представлял эту диссертацию к защите, и уже в тот момент мне показалось, что все эксперименты выполнены очень тщательно. На это вопрос я уже обращал внимание: даже характер замыкания дисульфидных связей был определен, подтверждена правильность их замыкания. Здесь никаких сомнений не возникает. И еще хотелось бы обратить внимание на нетривиальный подход человека, имеющего химическое образование, к получению аналогов достаточно короткого пептида. Казалось бы, проще всего осуществить химический синтез. Но здесь был использован другой подход, причем ничуть не хуже химического синтеза. Это уже больше зеленая химия. Я призываю голосовать «за».

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Спасибо. Кто-нибудь еще хотел бы выступить? Как директор Института, я тоже хочу добавить два слова. Я выражаю удовлетворение от того, что наш Учебно-научный центр обрел свое яркое и четкое научное лицо. С хорошими публикациями в очень бурно развивающейся области мировой науки, имеющей и теоретические, и практические выходы. Хочу выразить пожелание, в солидарность с тем, что говорила Людмила Алексеевна: хотелось бы, чтобы на следующих этапах мы больше акцентировали внимание при планировании работы на взаимодействии компонентов врожденного иммунитета с их мишенями. Чтобы были сведения не только о терапевтическом индексе, но и понимание на молекулярном уровне, откуда берется это различие в эффективности действия. Я призываю всех дружно проголосовать за присуждение искомой ученой степени. Кто еще хотел бы выступить? По-видимому, достаточно. Слово диссертанту.

**Пантелеев П.В.:**

Спасибо. Я хотел бы поблагодарить весь Учебно-научный центр, всю нашу лабораторию, наш дружный коллектив за ту приятную атмосферу, к которой мы работаем. Хотел бы поблагодарить Татьяну Владимировну за тот опыт, который можно получить, работая со всеми сотрудниками Учебно-научного центра. Мне было очень приятно этот опыт получать. Также хочу поблагодарить диссертационный совет, который прослушал эту работу, и всех тех людей, кто принимал в ней участие: сотрудники лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии Захара Шенкарева и Михаила Мышкина, сотрудников лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН, сотрудников ФГУП ГосНИИГенетика, которые любезно предоставили нам клинические изоляты для тестирования соединений. Также хотелось бы поблагодарить Татьяну Игоревну за помощь с оформлением документов. Безусловно, благодарю оппонентов за ту работу, которую они провели с диссертацией. И, конечно, я хотел бы поблагодарить свою семью, родных, близких людей. Это самое важное, поскольку они меня всецело поддерживают в том, что я делаю. Спасибо большое.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

У нас есть все основания объявить перерыв на голосование. Голосуем и не расходимся. (Проводится голосование.)

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Прошу внимания, прошу рассаживаться. Слушаем внимательно.

**Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:**

Пантелеев Павел Валерьевич. Роздано бюллетеней - 21, в урне - 21, «за» - 21. «Против» и недействительных бюллетеней нет.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Кто за то, чтобы утвердить заслушанные итоги? Кто не согласен? Все – «за».

(Проходит обсуждение проекта заключения совета. С учетом несущественных технических поправок заключение принято единогласно).

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Поздравим диссертанта с прекрасной защитой, а нас с успешно проведенной работой.

Спасибо за работу.

Председатель диссертационного совета,  
академик РАН



Иванов В.Т.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
д.ф.-м.н.

Олейников В.А.