

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
федерального государственного
автономного образовательного
учреждения высшего образования
"Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова"
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
доктор биологических наук

Денис Владимирович Ребриков



«14» 04 2021 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**федерального государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования "Российский национальный
исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова"
Министерства здравоохранения Российской Федерации
о научно-практической ценности диссертации
Колотьевой Наталии Александровны на тему
«Малые молекулы – переключатели обмена веществ», представленной
на соискание учёной степени доктора медицинских наук по
специальности 03.01.04 – биохимия**

Актуальность темы исследования

Одной из особенностей современного этапа развития науки является наличие большого объема данных о количестве образующихся белков в организме, интерес к изучению роли малых молекул в межмолекулярных взаимодействиях начал появляться лишь в последнее десятилетие, что открывает новые возможности и перспективы для медицины и биологии. Изучение потенциальных низкомолекулярных лигандов и степени их влияния на отдельные белок-белковые, фермент-субстратные

взаимодействия является потенциальным инструментом в регуляции функции белков. Диссертантом в своей работе в качестве белковой мишени для изучения особенностей взаимодействия метаболит-белок были выбраны каталитические белки, поскольку они проявляют высокую чувствительность к воздействию на них внешними стимулами, такими как органические соединения с малой молекулярной массой. Колоссальный вклад в подъем качества научных исследований и медицинской диагностики внесла разработка и применение лигандных технологий. Однако использование методов с высокой разрешающей способностью обостряет другую проблему – повышение чувствительности используемой аналитической системы к различным факторам, роль которых могут играть эндогенные метаболиты – биорегуляторы.

С этих позиций диссертационная работа Колотьевой Н.А. является несомненно актуальным исследованием, изучающим взаимодействия белков с малыми молекулами на модели образования белок-белковых комплексов, фермент-субстратных реакций в условиях влияния пирувата, лактата, малата и оксалоацетата как одних важных эндогенных интегральных метаболитов – переключателей обмена веществ. Вместе с тем, работа выявляет особенности жизнеспособности, метаболического профиля и активности ферментов клеточной культуры дермальных фибробластов после инкубации с биологически активными соединениями.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе новыми являются данные об особенностях межмолекулярного взаимодействия гликопротеинов группы крови АВ0 и антител при влиянии малыми молекулами пируватом и лактатом, что способствовало созданию двух патентов: патент № 2484480 от 10.06.2013 «Способ оценки действия биологически активных веществ на антиген-

антительное взаимодействие»; патент № 2680408 от 21.02.2019 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на аффинитет белок-лигандной связи».

С использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии диссертантом был использован новый подход для визуализации белковых комплексов в условиях влияния молекул с небольшой молекулярной массой с последующей количественной оценкой результатов взаимодействий, была получена заявка на патент 2020116810 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных соединений на взаимодействие антиген-антитело».

Впервые для изучения конформационных особенностей каталитических белков под влиянием различных концентраций малых молекул в температурном градиенте был использован метод дифференциальной сканирующей флуориметрии. Было выявлено, что оксалоацетат, малат, лактат и пируват в малых концентрациях вызывают термостабилизирующее действие на структуру белка лактатдегидрогеназы, и глицерофосфатдегидрогеназы, в высоких концентрациях снижают термостабильность ферментов, оформлен патент на изобретение № 2698628 от 28.08.2019 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на конформацию белка». Кроме того, было изучено влияние пирувата, лактата, оксалоацетата, малата на конформацию каталитических белков - лактатдегидрогеназы и глицерофосфатдегидрогеназы - в модельных экспериментах *in vitro* с применением метода микрокапиллярного термофореза. Были описаны равновесные константы диссоциации для взаимодействующих веществ. Также определено дозозависимое влияние оксалоацетата и малата на функционирование лактатдегидрогеназной системы: миллимолярные концентрации малых молекул ингибируют функцию лактатдегидрогеназы, микромолярные концентрации оказывают активирующее действие на активность каталитического белка.

Впервые получен блок новых данных метаболического профиля супернатанта и лизата клеток фибробластов при культивировании с пируватом, лактатом, оксалоацетатом и малатом, а также их влияние на жизнеспособность клеточной культуры. Показано стимулирующее действие оксалоацетата и малата на клеточную культуру дермальных фибробластов человека.

В процессе проведения этапов диссертационного исследования создана Программа для импорта данных, полученных с биохимического анализатора Cobas Integra 400 Plus (Свидетельство № 2010611397 от 17.02.2012).

Обоснованность использованных методов, а также полученных результатов и положений диссертации

Достаточно большой объем проведенной работы, высокий методический уровень, использование высокотехнологичных, чувствительных, аналитически надежных методов: иммуногематологического, биохимического, спектроскопического, лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, микрокапиллярного термофореза, дифференциальной сканирующей флуориметрии, клеточной культуры дермальных фибробластов, современного пакета программ статистического анализа, адекватных поставленным задачам, обуславливает достоверность и обоснованность результатов диссертационного исследования.

Научные положения и практические рекомендации четко аргументированы и достоверны. Выводы диссертации полностью соответствуют объему проделанной работы и отражают сущность исследования.

Всего опубликовано 75 печатных работ. По материалам диссертационной работы издано 57 публикаций, в том числе 18 статей,

входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК РФ, 7 статей в международных реферативных базах SCOPUS и Web of Science, получены 3 патента и 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Опубликованные работы отражают основные положения диссертационного исследования. Автореферат соответствует тексту диссертации.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов диссертации

Диссертационная работа Колотьевой Н.А. представляет значительный теоретический и практический интерес. В фундаментальном отношении разработана наглядная молекулярная модель, которая позволяет исследовать особенности белок-белковых взаимодействий в условиях *in vitro* под влиянием биологически активных веществ. Проведена серия экспериментов по оценке физико-химической, биологической активности малых молекул, установлена возможность использования их в качестве молекулярных зондов, а также для тестирования биологически активных соединений, в том числе эндогенного происхождения, фармакологических соединений, ксенобиотиков, гормонов.

С практической точки зрения, полученные результаты важно учитывать при постановке высокочувствительных иммунологических методов лабораторной диагностики, в основе которых лежит процесс белок-белкового взаимодействия, чувствительного к изменению концентрации интермедиатов эндогенного происхождения, таких как лактат, пируват, оксалоацетат. Необходимо принимать во внимание способность естественных интермедиатов, находящихся в биологических средах (кровь, ротовая жидкость), оказывать модифицирующее влияние на различные биологические процессы, что может повлиять на результаты

лабораторных исследований, и привести к их искажению. Таким образом, необходимо учитывать изменения в фонде метаболитов крови, в частности, оксалоацетата, пирувата, лактата при физиологических и патологических процессах на результаты биохимических, иммуногематологических, иммунофлуоресцентных клинических исследований.

Оценка языка и стиля диссертации

Структура диссертации замечаний не вызывает. Она состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной описанию объектов и методов исследования, четырех глав собственных данных, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, изложена на 300 страницах машинописного текста, иллюстрирована 31 таблицей и 37 рисунками. Указатель литературы содержит 453 источника, из которых 51 отечественный и 402 зарубежных авторов. Работа написана академично, литературным языком, тщательно выверена, хорошо иллюстрирована.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные Колотьевой Н.А. данные являются реальным вкладом в фундаментальную биохимию. Новые сведения о способности пирувата, лактата, оксалоацетата влиять на процессы белок-белкового, фермент-субстратного взаимодействий позволяют рекомендовать включение данных показателей в перечень параметров, определяемых при проведении биохимических, иммуногематологических исследований. Результаты диссертационного исследования Колотьевой Н.А. целесообразно внедрить в работу клинико-диагностических лабораторий.

Материалы исследования могут быть использованы в учебном процессе при проведении семинаров, практических занятий, лекций для студентов медицинских вузов по фундаментальной и клинической биохимии, при обучении ординаторов, слушателей циклов повышения квалификации по клинической лабораторной диагностике.

Рекомендуется дальнейшее развитие темы и продолжение исследований на кафедре фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Заключение

Диссертационная работа Колотьевой Наталии Александровны «Малые молекулы – переключатели обмена веществ» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические и практические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое решение актуальной фундаментальной задачи по изучению влияния малых молекул на процессы белок-белковых, фермент-субстратных взаимодействий и раскрытию природы этих взаимоотношений.

Диссертация по своей форме, методам исследования, научному содержанию, актуальности изучаемой проблемы, объему полученного автором материала, уровню аналитической и статистической обработки, обоснованности сформулированных выводов, новизне и достоверности положений, выносимых на защиту, соответствует требованиям п.9 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации "О порядке присуждения учёных степеней" от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к

докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Отзыв на диссертацию Н.А. Колотьевой заслушан и утвержден на заседании кафедры биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 3 от 2 апреля 2021 г.).

Профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук,
профессор
(специальность 03.01.04 – биохимия)

Александр Александрович
Терентьев

Ученый секретарь
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова
Минздрава России
к.м.н., доцент



О. М. Демина

117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1
e-mail: rsmu@rsmu.ru,
тел.: +7 (495) 434-14-22

СВЕДЕНИЯ

о федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва), назначенной ведущей организацией по докторской диссертации Колотьевой Наталии Александровны: "Малые молекулы – переключатели обмена веществ" по специальности 03.01.04 – биохимия, представленной для защиты в диссертационный совет Д 208.038.02, действующий на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (350063 г. Краснодар, улица Митрофана Седина, дом 4, т. (861)262-50-18), адрес электронной почты: corpus@ksma.kubannet.ru, адрес официального сайта в сети «Интернет»: <http://www.ksma.ru>

Полное и сокращённое название ведущей организации	федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России)
Место нахождения	г. Москва
Почтовый адрес	117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1
Телефон	+7 (495) 434-14-22
Адрес электронной почты	rsmu@rsmu.ru
Адрес официального сайта в сети «Интернет»	http://rsmu.ru/
Фамилия, имя, отчество, учёная степень, учёное звание руководителя ведущей организации	Сергей Анатольевич Лукьянов – академик РАН, доктор биологических наук, профессор, ректор
Фамилия, имя, отчество, учёная степень, учёное звание руководителя (заместителя руководителя) ведущей организации, утвердившего отзыв ведущей	Денис Владимирович Ребриков – доктор биологических наук, проректор по научной работе

организации	
<p>Фамилия, имя, отчество, учёная степень, учёное звание, должность, наименование подразделения, где работает сотрудник, составивший отзыв ведущей организации</p>	<p>Александр Александрович Терентьев – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета</p>
<p>Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Screening of some dioxaboreninopyridine and aniline derivatives for carcinogenic properties using a model cell-free system of regenerating rat liver/ S.P. Syatkin, A.A. Kirichuk, A.T.Soldatenkov, S.V. Kutyakov, E.V. Neborak, N.A. Shevkun, O.M. Kuznetsova, A.S. Skorik, A.A.Terent'ev //Bulletin of Experimental Biology and Medicine.– 2017. –Т. 162. № 6. –С. 801-807. 2. Определение клеточного рецептора CD95 и его лиганда CD95L на сперматозоидах мужчин разной фертильности /М.В.Плосконос , А.А.Терентьев.// Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2017. –№ 8-2. –С. 307-310. 3. Влияние синтетического пептида на течение экспериментальной язвы/ А.А.Терентьев, А.Э.Лычкова, А.Н. Казимирский, Ж.М. Салмаси, А.М.Пузиков//Доказательная гастроэнтерология. –2018. –Т. 7. –№ 1. С. 108a-108. 4. Способ оценки селективного изменения компартментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ /М.А.Фомина, Ю.В.Абаленихина, А.М.Кудлаева, А.А.Терентьев// Наука молодых (Eruditio Juvenium).–

	<p>2018. Т. 6. № 2. –С. 277-284.</p> <p>5. Изменения субклеточного распределения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ паренхиматозных органов крыс под действием модуляторов синтеза оксида азота/ М.А.Фомина, А.А.Терентьев//Исследования и практика в медицине. –2018. –Т. 5. № 3. –С. 28-39.</p> <p>6. Human EGF-derived direct and reverse short linear motifs: conformational dynamics insight into the receptor-binding residues/ N.T.Moldogazieva, I.M.Mokhosoev, A.A.Terentiev, K.V.Shaitan, O.V.Levtsova, M.Y. Antonov// Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.– 2018. –Т. 36. № 5.– С. 1286-1305.</p> <p>7. Reactive oxygen and nitrogen species–induced protein modifications: implication in carcinogenesis and anticancer therapy/ N.T.Moldogazieva, S.V.Lutsenko, A.A.Terentiev //Cancer Research.– 2018.– Т. 78. № 21. –С. 6040-6047.</p> <p>8. Влияние аргинина на активность и компартиментализацию лизосомальных цистеиновых протеиназ паренхиматозных органов при оксидативном стрессе на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии /М.А.Фомина, А.А. Терентьев// Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. –2018. –Т. 26. № 2. –С. 195-212.</p>
--	--

Ведущая организация подтверждает, что соискатель Колотьева Наталия

Александровна не является ее сотрудником и не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации или в соавторстве с ее сотрудниками.

Ученый секретарь
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова
Минздрава России
к.м.н., доцент

2.04.2021г



О. М. Демина