

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И.

Пирогова Минздрава России,

д.б.н., профессор РАН

Денис Владимирович Ребриков



2020 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 Кузьмичевой Валерии Игоревны на тему «Структурно-функциональный потенциал лактата в регуляции межмолекулярных взаимодействий», представленной на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

Актуальность темы исследования

Благодаря далеко шагнувшему прогрессу в изучении белок-белковых взаимодействий, стало понятно, что роль низкомолекулярных лигандов в регуляции этого процесса сильно недооценена. Малые молекулы, как известно, органические соединения с молекулярной массой от 40 до 1000 Да – способны оказывать непосредственное влияния на узнавание и связывание белков с их мишенями. Определение потенциальных низкомолекулярных лигандов и степени их влияния на отдельные белок-белковые взаимодействия является потенциальным инструментом в регуляции функции белков. В настоящее время существует несколько подходов для реализации данной задачи: метаболитцентрический – в основу которого положено определение биологических и терапевтических эффектов метаболита путем применения их как зондов при взаимодействии с

различными белковыми мишенями и протеинцентрический, где опорной точкой служит конкретный белок, для которого методами *in silico* определяют эндогенные метаболиты.

Диссертантом в своей работе был выбран метаболитцентрический подход для анализа биологических эффектов низкомолекулярного интермедиата лактата. Выбор этой молекулы представляется весьма актуальным: более, чем несколько десятилетий, считалось, что роль этой молекулы в обеспечении физиологических процессов крайне скромна и заключается лишь в участии в анаэробном катаболизме глюкозы и процессах глюконеогенеза. Проведенные диссертантом эксперименты *in silico* показали потенциальные биологические и фармакологические эффекты лактата, что определило вектор дальнейшего исследования: определение влияния на белок-белковое и фермент-субстратное взаимодействия.

Новизна исследования

В диссертационной работе впервые показана ассоциированность лактатдегидрогеназной каталитической системы с групповой принадлежностью крови по системе АВ0. Обладатели В (III) группы крови, имеют наибольшую активность лактатдегидрогеназы и содержание лактата и пирувата, а лица с 0 (I) группой крови – наименьшую активность лактатдегидрогеназы при достаточно высоких показателях лактата и пирувата.

Показана возможность применения метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для визуализации и количественной оценки изменений, вызываемых низкомолекулярными лигандами на процессы белок-белкового взаимодействия на примере модельной системы групп крови АВ0 (гликопротеины А и В, моноклональные антитела).

Диссертантом впервые разработан способ оценки влияния лактата на аффинитет связи белок-лиганд (**патент № 2680408 от 21.02.2019 «Способ**

выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на аффинитет белок-лигандной связи»).

Впервые получены результаты, описывающие изменение конформационной устойчивости каталитического белка лактатдегидрогеназы в температурном градиенте при добавлении оксалоацетата, предложен новый подход для количественной оценки изменений конформации и термолабильности (патент №2698628 от 13.06.2019 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на конформацию белка»).

Практическая значимость и научная ценность

Разработана математическая модель для аппроксимации результатов дифференциальной сканирующей флуориметрии, позволяющая оценивать и давать подробную характеристику влияния органических соединений на конформационную лабильность белка и его температуру плавления.

С практической точки зрения полученные результаты важно учитывать при проведении таких лабораторных методов исследования как иммуноферментный анализ, иммунохемилюминесцентный анализ, в основе которых лежит процесс белок-белкового взаимодействия, чувствительного к изменению концентрации лактата. Также необходимо принимать во внимание способность лактата оказывать модифицирующее влияние на различные биологические процессы, что особенно важно при проведении анализов у пациентов при гиперлактатемии. Специфика реакции антигенных детерминант А и В при введении различных веществ в эту систему диктует необходимость учета групповой принадлежности крови по системе АВ0 при назначении лекарственных препаратов.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации

Работа выполнена на достаточном клиническом и лабораторном материале: проведено обследование 210 клинически здоровых лиц, с определением групповой принадлежности крови по системе АВ0, а также содержания в венозной крови лактата, пирувата и активности лактатдегидрогеназы.

Эксперименты по изучению конформационной лабильности и функциональной активности лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) были проведены в отделении молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» (г.Санкт-Петербург). Диссертант использовал высокоочищенный белок фирмы Sigma-Aldrich (США): лактатдегидрогеназа из мышц кролика тип XI (лиофилизат), а также оксалоацетат и буферные растворы (Sigma-Aldrich, США).

Полученные автором результаты достоверны, выводы и заключения обоснованы. Научные положения, вынесенные на защиту в форме научных утверждений, вытекающих из выводов, характеризуют вклад диссертанта в решение научной проблемы, отличающийся полученными новыми знаниями, дополняющий существующую систему данных о протеоме и метаболоме человека.

Оценка содержания диссертации

Диссертация построена по традиционной схеме, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа изложена на 207 страницах машинописного текста с приложениями и состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы, иллюстрирована 12 таблицами и 47 рисунками. Указатель литературы содержит 342 источника, из которых 41 отечественных и 301 зарубежных авторов.

Во введении автором обоснована актуальность выбранной темы, на основании анализа существующих представлений и круга нерешенных

вопросов по проблеме сформулирована цель исследования, которая заключается в изучении структурно-функционального потенциала лактата и влияния этого интермедиата на внутри- и межмолекулярные взаимодействия, в частности, белок-белковые и фермент-субстратные, а также шесть задач, последовательное решение которых обеспечило достижение поставленной цели.

Первая глава «Обзор литературы» написана с привлечением достаточно большого количества литературных источников как отечественных, так и зарубежных авторов. В соответствии с задачами исследования первая глава диссертации разделена на подглавы. Обзор литературы охватывает основной круг вопросов по исследуемой проблеме, носит аналитический характер, читается легко, обширен, ориентирован на цель и задачи исследования.

Диссертантом проанализированы имеющиеся данные о роли малых молекул в регуляции различных внутри- и межклеточных процессов, представлены современные концепции понимания функциональной роли лактата в обеспечении физиологических и патологических процессов, что доказывает перспективность подробного изучения биологического потенциала исследуемого метаболита, приведены актуальные программы и подходы к компьютерному моделированию межмолекулярных взаимодействий и прогнозирования фармакологических и биологических эффектов органических соединений.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. Были использованы биохимические, иммунно-гематологические, оптические и флуоресцентные методы. Дизайн проведенного исследования дает ясное представление о поэтапной схеме и количественных характеристиках выполненной работы. Полно описаны принципы биохимических методов, использованных в ходе выполнения исследований, а также примененные методики микрокапиллярного термофореза и дифференциальной сканирующей флуориметрии. Используемые в работе методы, в целом, адекватны задачам, информативны, современны и доказательны. Завершается

глава сведениями об использованных в ходе анализа полученных данных статистических программ и критериев.

Третья глава посвящена методам компьютерного моделирования в программах PASS и STITCH, с применением которых были предсказаны биологические эффекты лактата и его потенциальные белковые партнеры взаимодействия. Поскольку только в эксперименте можно найти подтверждение или опровергнуть спрогнозированные результаты, дальнейшее исследование было посвящено изучению отдельных смоделированных биологических активностей лактата.

В четвертой главе приводятся собственные результаты исследований по изучению влияния лактата на белок-белковое взаимодействие с применением модельной системы групп крови АВ0 (антигены А и В, естественные и моноклональные антитела). Автором установлено, что внесение лактата в экспериментальную систему приводит к замедлению вступления антигенов и антител в реакцию агглютинации. Так, например, гликопротеин А, содержащий в качестве терминального фрагмента N-ацетилгалактозамин более чувствителен к введению лактата в сравнении с гликопротеином В, терминальным углеводом которого является D-галактоза. Автором был предложен подход к визуализации и количественной характеристики вызванных изменений с применением метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Полученные в ходе данного эксперимента результаты обосновали важность изучения влияния низкомолекулярных лигандов на индивидуальные белки.

В пятой главе обсуждается влияние оксалоацетата, который был выбран в качестве низкомолекулярного агента, на конформационную лабильность и функциональную активность лактатдегидрогеназы. Были применены современные высокотехнологичные методы оценки конформации белковой молекулы: микрокапиллярный термофорез и дифференциальная сканирующая флуориметрия. Определено, что низкие концентрации оксалоацетата оказывают протективное воздействие на конформацию белка и

активирующее – на его функциональное проявление, в то время как более высокие – дестабилизирует белок и ингибируют его функцию.

Таким образом, было установлено, что проведенный анализ и выявленные в ходе диссертационного исследования зависимости подчеркивают целесообразность дальнейшего изучения лигандной роли эндогенных интермедиатов малой молекулярной массы в процессах взаимодействия с более крупными структурами, в частности, с белками, поскольку способны вызывать структурные изменения, отражающиеся в функциональном проявлении.

Заключение представляет собой развернутое обсуждение полученных результатов исследований и содержит основные положения диссертации, на основании которых автор делает выводы и обосновывает практические рекомендации. Выводы сформулированы в должном соответствии с полученными диссертантом данными на основании их глубокого анализа. Значимость для науки и практики полученных результатов несомненна.

В целом, заключение рассматриваемой диссертационной работы представляет собой последовательное, логически стройное подведение итогов в связи с целью и задачами, поставленными во введении.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования применяются в учебном процессе на кафедре фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ, а также используются в работе клинико-диагностических лабораторий клиник ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ, ГБУЗ СОКБ им. В.Д. Середавина, ГБУЗ СОДКБ им.Н.Н.Ивановой.

Подтверждение публикаций по теме диссертации

Всего по материалам диссертационной работы опубликовано 27 научных работ, из них 8 – в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки

России для опубликования основных научных результатов диссертации, 2 работы, индексируемые международной реферативной базой SCOPUS, получено 2 патента и разработана 1 программа для ЭВМ.

Замечания и вопросы по диссертации

Принципиальных замечаний по работе нет. В диссертационной работе имеются опечатки и несогласованные предложения. Однако указанные недочеты не носят принципиального характера и не уменьшают научной и практической значимости проведенного исследования.

Заключение:

Диссертационная работа Кузьмичевой Валерии Игоревны «Структурно-функциональный потенциал лактата в регуляции межмолекулярных взаимодействий» 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 взаимодействия лигандов с низкой молекулярной массой с белковыми молекулами 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 кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Отзыв на диссертацию В.И. Кузьмичевой 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 № 1 от 20.04. 2020 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



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 кандидатской диссертации Кузьмичевой Валерии Игоревны на тему: "Структурно-функциональный потенциал лактата в регуляции межмолекулярных взаимодействий" по специальности 03.01.04 – биохимия, представленной для защиты в диссертационный совет Д208.038.02, 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, ректор
Фамилия, имя, отчество, учёная степень, учёное звание руководителя (заместителя руководителя) ведущей организации,	Денис Владимирович Ребриков – доктор биологических наук, профессор РАН, проректор по научной работе

утвердившего отзыв ведущей 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. Kutyaakov, 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. 108а-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).–
2018. Т. 6. № 2. –С. 277-284.

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.
6. Human EGF-derived direct and reverse short linear motifs: conformational dynamics insight into the receptor-binding residues/ N.T.Moldogazieva, I.M.Mokhosoiev, 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.
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.
8. Влияние аргинина на активность и компартментализацию 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.

Ведущая организация подтверждает, что соискатель Кузьмичева Валерия Игоревна 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
д.м.н., доцент



07.04.2016

Милушкина Ольга Юрьевна