



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии
Российской академии наук
ЦТП ФХФ РАН

«26» октября 2017 г.

Москва, 119991, ул. Косыгина 4, т. 7-495-938-2533

№ 108-НО



УТВЕРЖДАЮ

Директор ЦТП ФХФ РАН

Член-корреспондент РАН

Доктор биологических наук

Атауллаханов Ф.И.

«26» октября 2017

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Курдюмова Алексея Сергеевича «Получение и свойства рекомбинантной дестабилазы – полифункционального фермента медицинской пиявки», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

Диссертационная работа посвящена получению и характеристике рекомбинантной дестабилазы медицинской пиявки – первого описанного представителя полифункциональных лизоцимов беспозвоночных, сочетающего мурамидазную и эндо-ε-(γ-Glu)-Lys-изопептидазную активности. Действие фермента направлено на растворение стабилизированного фибрина не путем протеолиза, а путем изопептидолиза связей ε-(γ-Glu)-Lys в молекуле фибрина. Поэтому дестабилаза медицинской пиявки является потенциальным тромболитическим агентом с принципиально новым механизмом

тромболизиса. В работе Курдюмова А. С. получают и исследуются все известные изоформы данного белка как в прокариотических, так и в эукариотических системах экспрессии.

Диссертация написана по классическому плану, изложена на 159 страницах и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение результатов, Заключение, Выводы, Список сокращений и Список использованной литературы, состоящий из 147 источников. Значительная часть цитируемых источников представлена литературой последних 10 лет, что говорит об актуальности проведённого исследования.

В разделе «Введение» отражены актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимости проведённого исследования.

Обзор литературы разделён на 3 основные части, подводящий к более полному пониманию полученных результатов. В первой части описана проблема тромбозов в России и мире, методы лечения и профилактики этих заболеваний, описана система гемостаза человека. Во второй части подробно рассказано об одном из дополнительных методов лечения и профилактики болезней – гирудотерапии. Рассмотрен состав секрета слюнных желёз медицинской пиявки и действие секрета на организм. В третьей части подробно изложена известная на сегодняшний день информация об изучаемом ферменте – дестабилазе медицинской пиявки.

В главе «Материалы и методы» представлены и подробно изложены современные биотехнологические методы и подходы генной инженерии, которые использовались в работе.

Разделы «Результаты» и «Обсуждение» отражают полученные данные и их интерпретацию. Курдюмовым А.С. в клетках *Escherichia coli* были получены все известные изоформы дестабилазы: Dest1, Dest2 и Dest3. Впервые получена рекомбинантная Dest2 в эукариотических системах экспрессии: в дрожжах *Pichia pastoris* и культуре клеток почки человека линии Expi293F. Для данных ферментов определены зависимости мурамидазной и изопептидазной активностей от pH и ионной силы среды. Впервые показана антимикробная активность триптических пептидов дестабилазы по отношению к *E. coli* и *Bacillus subtilis*. Алексеем Сергеевичем был разработан эффективный способ получения рекомбинантной Dest2 в клетках бактерий *E. coli*. В результате работы автор добился увеличения выхода очищенной ренатурированной Dest2 в пять раз (по сравнению с ранее имеющимся методом). В системе *E. coli* Курдюмову А. С. удалось получить Dest2 в растворимой форме: в виде слитого белка с шапероном SlyD.

Новизна и практическая значимость полученных результатов не вызывают сомнений. Данные, полученные в настоящей работе, могут стать основой исследования взаимосвязи между мурамидазной и изопептидазной активностями мультифункционального фермента, пониманию механизма антибактериальной активности дестабилазы. Разработанный метод получения дестабилазы позволит получать рекомбинантный белок в больших количествах, что позволит провести доклинические и клинические испытания фермента в качестве нового тромболитического препарата.

В диссертации можно отметить некоторые незначительные недостатки. Было бы интересно расширить функциональное тестирование полученного препарата. Присутствуют некоторые погрешности оформления или обзора, такие как присутствие английского языка на отдельных рисунках (например, рис. 7) или смешанное использование точки и запятой для отделения десятичных значений (запятая на последней строчке страницы 111 "рН 6,3", но точка в подписи к рисунку на той же странице "p<0.05"), поверхностное освещение механизмов тромбозов в обзоре литературы (спорное утверждение о том, что главная причина тромбообразования – это увеличение скорости свёртываемости крови на стр. 14), отсутствие в отдельных рисунках пояснений по статистике (например, на рисунке 32 указано $n=5$, но не указано к сравнению каких точек относится утверждение $p<0.05$; а на следующем рисунке 33 не указано n). Однако, все указанные недостатки не являются принципиальными и не снижают общей высокой оценки работы.

Методы и результаты выполненного исследования могут быть использованы в работах МГУ им. М. В. Ломоносова, Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, ФИЦ биотехнологии РАН, НМИЦ гематологии Минздрава России, Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта и др.

Содержание диссертации полностью отражено в публикациях автора в научных рецензируемых международных журналах, и представлены на международных и российских научных конференциях. Следует особо подчеркнуть высокий уровень публикаций и полное соответствие профиля журналов специальности диссертации, а также апробацию исследования на международном уровне, причем как на профессиональных конгрессах гемостазиологов, так и среди специалистов-биохимиков и молекулярных биологов. По актуальности, новизне полученных результатов, объему, уровню выполнения диссертационная работа Курдюмова Алексея Сергеевича «Получение и свойства рекомбинантной дестабилазы – полифункционального фермента медицинской пивки» соответствует критериям п.9 Положения о порядке присуждения ученых

степеней, утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 с внесенными изменениями от 21 апреля 2016 г. №335, является научно-квалификационной, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

Заключение принято на заседании Ученого совета Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН.

Присутствовало на заседании 13 чел. из 18 членов Ученого совета. Результаты голосования: «за» - 13 чел., «против»- 0 чел., «воздержалось» -0 чел., протокол № 10 от «11» октября 2017 г.

Заместитель директора, заведующий лабораторией молекулярных механизмов гемостаза Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, доктор физико-математических наук



Пантелеев Михаил Александрович

119991, г. Москва, ул. Косыгина 4, ЦТП ФХФ РАН

Тел: 8(495) 938-25-33

Адрес электронной почты: mapanteleev@yandex.ru