

**Заключение диссертационного совета Д 001.010.01 на базе
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени
В.Н. Ореховича» по диссертации на соискание ученой степени
кандидата наук**

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 30 ноября 2017 г. № 22

О присуждении Курдюмову Алексею Сергеевичу, гражданину РФ учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Получение и свойства рекомбинантной дестабилазы – полифункционального фермента медицинской пиявки», по специальности 03.01.04 – биохимия принята к защите 14 сентября 2017 г., протокол № 14, диссертационным советом Д 001.010.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», 119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, созданного Приказом Минобрнауки России № 105/нк от 11.04.2012 г. с внесением изменений Приказ Минобрнауки России № 913/нк от 14.06.2016 г.

Соискатель Курдюмов Алексей Сергеевич, 1990 года рождения. В 2013 году соискатель окончил Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)». В 2016 г. окончил очную аспирантуру по специальности 03.01.04 – биохимия при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства России.

Диссертация выполнена в лаборатории генной инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства России.

Научный руководитель – доктор биологических наук, доцент Лазарев Василий Николаевич, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства России, заведующий лабораторией.

Официальные оппоненты:

Вейко Владимир Петрович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, лаборатория молекулярной инженерии, главный научный сотрудник;

Бигильдеев Алексей Евгеньевич, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатории физиологии кроветворения, научный сотрудник

дали положительные отзывы о диссертации.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, гор. Москва, в своём положительном заключении, подписанном Пантелеевым Михаилом Александровичем, доктором физико-математических наук, лаборатория молекулярных механизмов гемостаза, заведующий лабораторией, заместитель директора по науке, указала на некоторые недостатки и погрешности оформления работы. В частности, отмечено поверхностное освещение механизмов тромбозов в обзоре литературы, отсутствие в отдельных рисунках пояснений по статистике, было бы интересно расширить функциональное тестирование полученного в работе препарата. Однако, все указанные недостатки не являются принципиальными и не снижают общей высокой оценки работы, новизна, актуальность и практическая значимость которой не вызывает сомнений.

Соискатель имеет 14 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 14 работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях - 3.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

- 1) Курдюмов А.С., Манувера В.А., Ахаев Д.Н., Баскова И.П., Лазарев В.Н. Рекомбинантная дестабилаза медицинской пиявки: получение и свойства. //Биоорганическая химия. - 2016. - Т.42. - С.50-61. Работа посвящена получению рекомбинантной дестабилазы-2 в клетках кишечной палочки: получены плазмиды, кодирующие аналог природной дестабилазы, штаммы-продуценты различных форм белка, оптимизирован процесс культивирования и ренатурации. Исследована мурамидазная, литическая и антибактериальная активности полученных белков. Экспериментальная работа, обработка полученных результатов и написание статьи полностью выполнены соискателем.
- 2) Kurdyumov A.S., Manuvera V.A., Baskova I.P. and Lazarev V.N. A comparison of the enzymatic properties of three recombinant isoforms of thrombolytic and antibacterial protein—Destabilase-Lysozyme from medicinal leech // BMC Biochemistry. - 2015. - V.16. –P. 1-12. В работе представлены результаты по получению трёх рекомбинантных изоформ дестабилазы в клетках кишечной палочки. Исследованы мурамидазная, фибринолитическая, изопептидазная и антибактериальная активности полученных изоформ. Проведено сравнение исследованных активностей. Экспериментальная работа, обработка полученных результатов и написание статьи полностью выполнены соискателем.
- 3) Manuvera V.A., Kurdyumov A.S., Filonova K.A., Lazarev V.N. Generation of recombinant destabilase-lysozyme from medicinal leeches in three different expression systems. // Protein Expr Purif. - 2015. - V.116 – P.50-58. Работа посвящена получению дестабилазы-2 в различных организмах: клетках кишечной палочки, клетках дрожжей *Pichia pastoris* и клетках почки эмбриона человека линии Expi293F. Проведено сравнение мурамидазной, изопептидазной, фибринолитической и антимикробной активностей полученных ферментов. Соискатель принимал непосредственное участие во всех этапах подготовки статьи.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от:

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Вейко Владимира Петровича, Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, в котором отмечены актуальность, своевременность, новизна и практическая значимость диссертационной работы. Тем не менее, указан ряд орфографических и стилистических ошибок, а также опечаток, сделано замечание по оформлению списка литературы. Кроме того, отмечается, что автору следовало бы лучше продумать формат представления экспериментального материала в связи с его огромным количеством; приведены излишние подробности в описании структур достаточно хорошо известных реципиентных плазмид, также было бы полезно экспериментально проанализировать полноту трипсинолиза дестабилазы и структуру фрагментов образующихся полипептидов. Однако, высказанные замечания, кроме формата представления материала, носят характер пожеланий автору.

В отзыве официального оппонента кандидата биологических наук Бигильдеева Алексея Евгеньевича, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации имеется ряд вопросов, в частности: чем обусловлен выбор Dest2 при оптимизации получения дестабилазы, ведь в обзоре написано, что мурамидазная активность Dest3 в 4 раза выше, чем у Dest2; почему мурамидазную активность определяли двумя методами; какова причина того, что дестабилаза, подвергнутая рефолдингу из телец включения *Escherichia coli*, не расщепляет хромогенный субстрат γ -Glu- ϵ -Lys; почему автор недостаточно внимания уделил получению дестабилазы в эукариотических клетках. Однако заданные вопросы ни в коей мере не умаляют высокой научной значимости полученных результатов и не снижают хорошего впечатления от этой основательной и серьезной работы.

В положительном отзыве на автореферат Шмарова Максима Михайловича, доктора биологических наук Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и

микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии, замечаний нет.

В положительном отзыве на автореферат Зеркаленковой Елены Александровны, кандидата биологических наук Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, старшего научного сотрудника лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики, отмечается некоторое количество неточностей, затрудняющих знакомство с авторефератом. В частности, данные таблицы 2 противоречат значениям минимально ингибирующей концентрации для различных форм дестабилаз, приведенным в заключении; не указано значение антимикробной активности дестабилазы, ренатурированной из телец включения; не совсем понятен выход рекомбинантной дестабилазы при ее получении в дрожжевой системе. Тем не менее, в целом диссертантом решены все поставленные задачи с использованием современных генно-инженерных, биохимических и молекулярно-биологических методов исследования. Новизна и практическая значимость не вызывает сомнения.

В положительном отзыве на автореферат Кузьмина Владислава Стефановича, кандидата биологических наук ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет, доцент кафедры физиологии человека и животных, указано на присутствие в автореферате нескольких опечаток, которые однако, ни в коей мере не затрудняют понимание работы и не снижают логичность изложения. Отмечается, что задачи исследования сформулированы кратко и понятно, выводы являются логичными и взвешенными, что свидетельствует о научной зрелости диссертанта.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обоснован тем, что д.б.н. Вейко В.П. является ведущим специалистом в области генной инженерии и рекомбинантных белков терапевтического назначения, к.б.н. Бигильдеев А.Е. является специалистом в области гематологии и физиологии кроветворения, что

подтверждается значительным количеством публикаций в данной области. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук - один из ведущих научных центров, занимающийся фундаментальными и прикладными исследованиями в области фармакологии, в частности ведутся работы по системной биологии, регуляции гемостаза и тромбоза.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

впервые в клетках *E. 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. Впервые 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*;

разработан эффективный способ получения рекомбинантной Dest2 в клетках бактерий *E. coli* с увеличенным в пять раз выходом очищенной ренатурированной Dest2 по сравнению с ранее имеющимся методом.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: полученные данные могут стать основой исследования взаимосвязи между мурамидазной и изопептидазной активностями мультифункционального фермента, понимания механизма антибактериальной активности дестабилазы.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработанный метод получения дестабилазы в больших количествах позволит провести доклинические и клинические испытания фермента в качестве нового тромболитического препарата. Подробное описание всех полученных экспериментальных данных по разработке подхода к получению рекомбинантной дестабилазы дает возможность последующим исследователям более четко планировать аналогичные разработки, опираясь на ценный экспериментальный опыт автора диссертации.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что результаты получены с использованием современных инструментальных методов, с проведением, в ряде случаев, независимых экспериментов. Обсуждение результатов проведено с учетом современных данных медицинской и биологической наук. Научные положения и выводы обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

Личный вклад соискателя состоит в том, что экспериментальная работа, обработка полученных результатов и написание статей полностью выполнены соискателем.

На заседании 30 ноября 2017 г. диссертационный совет принял решение присудить Курдюмову Алексею Сергеевичу учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 10 докторов наук по специальности 03.01.04 – «биохимия», участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 17, против - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Зам. председателя Диссертационного совета Д 001.010.01
доктор биологических наук, профессор

Медведев А.Е.

Ученый секретарь Диссертационного совета Д 001.010.01
кандидат химических наук

Карпова Е.А

30 ноября 2017 года

