ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.039.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМ. Н.М. ЭМАНУЭЛЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 16.12.2020 г., протокол № 14

О присуждении Васильевой Александре Дмитриевне, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Индуцированное окисление коагуляционного фактора XIII: структурно-функциональные нарушения» по специальности 03.01.02 – биофизика принята к защите 16 сентября 2020 года, протокол №7, диссертационным советом Д 002.039.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4; приказ Министерства образования и науки 105/нк от 11 апреля 2012 года.

Соискатель – Васильева Александра Дмитриевна, 1991 года рождения, в 2015 году окончила Педагогический институт им. В.Г. Белинского Пензенского Государственного университета по специальности «биохимия». С 1 октября 2015 года по 1 октября 2019 года обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по специальности 03.01.02 – биофизика. С 2015 года по настоящее время работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук в лаборатории термодинамики биосистем в должности научного сотрудника.

Диссертация выполнена в лаборатории термодинамики биосистем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор **Марк Александрович Розенфельд**, заведующий лабораторией термодинамики биосистем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Пантелеев Михаил Александрович, доктор физико-математических наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук;

Козин Сергей Александрович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации в своем положительном заключении, составленном доктором биологических наук, профессором Ланкиным Вадимом Зиновьевичем, руководителем Отдела биохимии свободнорадикальных процессов и утвержденном генеральным директором Центра, доктором медицинских наук, профессором, академиком РАН Бойцовым Сергеем Анатольевичем, указывает, что диссертация, несомненно, является актуальной, поскольку направлена на изучение механизмов действия окислительного стресса на системы гемостаза, которые могут приводить к возникновению дисбаланса между

коагуляционной и фибринолитической системами, тем самым инициируя развитие опасных для жизни состояний. В отзыве подчеркнуто, что в результате проведенной работы, автором выявлен ряд аминокислотных остатков, окисление которых приводит к угнетению функции коагуляционного фактора XIII, а также использован подход, являющийся перспективным для поиска диагностически значимых модификаций аминокислотных остатков. В заключение отмечается, что диссертационная работа Васильевой А. Д. на тему «Индуцированное окисление коагуляционного фактора XIII: структурно-функциональные нарушения» является законченной научно-квалификационной работой, которая по новизне, значимости и методическому уровню соответствует требованиям ВАК и пунктам 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года в редакции с изменениями, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 1 октября 2018 года №1168, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Васильева А.Д. заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Соискатель имеет 18 работ по теме диссертации, в том числе 6 статей, опубликованных в рецензируемых российских и международных научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и включенных в базы цитирования и 12 тезисов докладов на международных конференциях.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Vasilyeva, A. Oxidation-induced modifications of the catalytic subunits of plasma fibrin-stabilizing factor at the different stages of its activation identified by mass spectrometry / A. Vasilyeva; L. Yurina; M. Indeykina; A. Bychkova; A. Bugrova; M. Biryukova; A. Kononikhin; E. Nikolaev; M. Rosenfeld // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. - 2018. - V. 1866, № 8. - P. 875–884.

2. Rosenfeld, M.A. Oxidation of proteins: is it a programmed process? / M.A. Rosenfeld, A.D. Vasilyeva, L.V. Yurina, A.V. Bychkova // Free Radic. Res. - 2018. - V. 52, № 1. - P. 14–38.
3. Vasilyeva, A. The structure of blood coagulation factor XIII is adapted to oxidation / A. Vasilyeva, L. Yurina, A. Shchegolikhin, M. Indeykina, A. Bugrova, A. Kononikhin, E. Nikolaev, M. Rosenfeld // Biomolecules. - 2020. - V. 10, 914.

На автореферат поступило 3 положительных отзыва: **1.** отзыв д.б.н. **Виктора Александровича Тронова**, ведущего научного сотрудника лаборатории физической химии биополимеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук; **2.** отзыв к.б.н. **Благодатского Артема Сергеевича**, научного сотрудника лаборатории геномной инженерии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)»; **3.** отзыв к.м.н. **Роговского Владимира Станиславовича**, старшего научного сотрудника кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В. Сергеева медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова. Все отзывы без замечаний.

В отзывах отмечено, что тема диссертации является крайне актуальной, полученные в работе результаты имеют как фундаментальное, так и прикладное значение, а также обладают абсолютной новизной и подробно описывают изменения в первичной структуре коагуляционного фактора XIII при воздействии окислителей: методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения был выявлен набор модифицированных аминокислотных остатков, определена химическая природа этих модификаций, а также процентное содержание модифицированных аминокислотных остатков. Результаты и выводы работы соответствуют

поставленным задачам, их достоверность не вызывает сомнений. В качестве достоинств работы отмечены ее высокий теоретический и экспериментальный уровень, ясность изложения и грамотные иллюстрации.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их специализацией по проблеме настоящей диссертационной работы и достижениями в области структуры белков, физиологии и биофизики крови, биохимии свободнорадикальных процессов, а также наличием публикаций в соответствующей сфере исследования, что позволяет им оценить научную и практическую значимость диссертации. Оппонент д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН Пантелеев М.А. является ведущим специалистом в области регуляции и компьютерного моделирования процессов в системе свертывания крови. Оппонент к.б.н., Козин С.А. является ведущим специалистом в области исследования структурных основ функционирования макромолекул, в том числе роли посттрансляционных модификаций и аминокислотных замен в патогенезе заболеваний. Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации является ведущим центром в области изучения биофизики, биохимии и молекулярной медицины для диагностики, лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе атеросклероза, тромбозов, ишемической болезни сердца и др.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана новая научная концепция, существенно расширяющая представления о функционировании белков плазмы крови в условиях постоянной генерации активных форм кислорода, согласно которой нарушение функциональной активности фермента FXIII при окислении представляется компенсаторным механизмом, призванным уменьшить количество стабилизирующих ковалентных сшивок между окисленными

молекулами фибрина, формирующими аномальную плотную структуру, устойчивую к гидролизу плазмином;

предложена оригинальная научная гипотеза, согласно которой в процессе антиоксидантной структурной эволюции белки плазмы, не находясь под защитой мощной антиоксидантной ферментативной системы подобно клеточным белкам и постоянно подвергаясь воздействию активных форм кислорода, были наделены определенными антиоксидантными структурными элементами, назначение которых - служить в качестве перехватчиков свободных радикалов, защищая тем самым ключевые в функциональном отношении и наиболее уязвимые к окислению аминокислотные остатки белков;

доказано наличие определенных структурных областей, обладающих антиоксидантными функциями в молекуле коагуляционного фактора XIII; соответственно,

введен новый термин – антиоксидантные структурные элементы, для обозначения структурных областей, выступающих в качестве перехватчиков свободных радикалов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения о наличии в структуре белков аминокислотных остатков (на примере коагуляционного фактора XIII), выполняющих функцию перехватчиков свободных радикалов, расширяющие границы применимости полученных результатов в области выявления диагностически значимых окислительных модификаций при различных заболеваниях;

применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, то есть с получением обладающих новизной результатов) использован комплекс методов для исследования белков, таких как электрофорез ПААГ, колориметрия, ферментативный гидролиз белков, методы хроматографии, тандемная хромато-масс-спектрометрия ультравысокого разрешения;

изложены экспериментальные данные, свидетельствующие о взаимосвязи результатов анализа окислительной модификации первичной структуры молекулы и активности образцов коагуляционного фактора FXIII при его окислении на разных стадиях активации, дополняющие представления о возможном действии внутренней регуляции системы гемостаза в условиях избыточной концентрации АФК в плазме крови;

изучены масс-спектры пептидов контрольных и окисленных образцов коагуляционного фактора XIII на разных стадиях активации, что позволило при сравнении их с результатами анализа активности данных образцов, предположить наличие ранее неизвестной функциональной роли у некоторых аминокислотных остатков белка, модификация которых приводит к угнетению активности коагуляционного фактора XIII.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

определен механизм нарушения функциональной активности коагуляционного фактора XIII при воздействии окислителей на разных стадиях его активации, который может быть использован для разработки новых способов фармакологической регуляции активности прокоагулянтных и фибринолитических систем в условиях окислительного стресса для профилактики развития тромбозов и других патологических состояний;

представлены закономерности распределения окислительных посттрансляционных модификаций в молекуле белка, которые могут быть использованы в разработке подходов для анализа диагностически значимых окислительных модификаций в клинических исследованиях.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ результаты получены на сертифицированном оборудовании с применением современных биофизических и биохимических методов исследования, стандартных методик обработки результатов; показана воспроизводимость результатов;

сформулированные в диссертации научные положения и выводы достоверны и полностью подтверждаются экспериментальными данными;

теория основывается на известных литературных данных о воздействии на структуру белков различных окислителей и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

идея базируется на обобщении передового опыта исследований структуры коагуляционного фактора XIII и ее конформационных превращений в процессе активации и на анализе практики поиска посттрансляционных модификаций белков методом тандемной масс-спектрометрии ультравысокого разрешения;

использованы авторские данные и данные, полученные и опубликованные другими исследователями, по рассматриваемой тематике;

установлено качественное соответствие авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках об окислительной модификации белков;

использованы современные методики сбора и обработки полученных данных, в том числе биоинформатические программы для анализа масс-спектров (PEAKS Studio v. 8.5, Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canada); OriginPro для статистической обработки и построения графиков и VMD - Visual Molecular Dynamics (Theoretical and Computational Biophysics Group, NIH Center for Macromolecular Modeling and Bioinformatics, at the Beckman Institute, University of Illinois at Urbana-Champaign) для визуализации белковой структуры.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах работы, в том числе анализе данных литературы, планировании и проведении научных экспериментов, обработке полученных результатов с помощью специализированного программного обеспечения, апробации результатов исследования на конференциях и семинарах, а также подготовке публикаций по результатам работы.

Диссертация Васильевой А.Д. «Индуцированное окисление коагуляционного фактора XIII: структурно-функциональные нарушения» представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, удовлетворяющую требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в пунктах 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 1 октября 2018 года №1168, в которой впервые были предложены механизмы нарушения молекулярной структуры и функциональной активности коагуляционного фактора XIII на разных стадиях его активации при индуцированном окислении, имеющие важное значение для понимания влияния окислительного стресса на систему гемостаза.

На заседании 16 декабря 2020 года диссертационный совет принял решение присудить Васильевой Александре Дмитриевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 7 докторов наук по специальности 03.01.02 – биофизика, участвовавших на заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени – 19, против присуждения ученой степени – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель
диссертационного совета, д.х.н. Трофимов А.В.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.х.н. Мазалецкая Л.И.

16 декабря 2020 г.