НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ)

мкр. Орлова роща, д. 1, г. Гатчина, Ленинградская область, 188300
Телефон: (81371) 4-60-25, факс: (81371) 3-60-25. E-mail: dir@pnpi.nrcki.ru
ОКПО 02698654, ОГРН 1034701242443, ИНН 4705001850, КПП 470501001

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по научной работе
НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ

№ 3

«05» декабря 2017 г.

_____ д.б.н. **С.В. Саранцева**

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

– Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» – на диссертацию **Куликовой Вероники Алексеевны «Механизмы образования и взаимодействия внутри- и внеклеточных пулов рибозидов никотинамида и никотиновой кислоты в клетках человека»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Рецензируемая диссертация посвящена актуальной теме установления механизмов образования и поддержания внутриклеточных пулов таких ключевых метаболитов биосинтеза никотинамидадениндинуклеотида (NAD), как рибозид никотинамида (NR) и рибозид никотиновой кислоты (NAR). Динуклеотид NAD хорошо известен как кофермент окислительно-восстановительных реакций ключевых метаболических путей, в которых он выступает в роли переносчиков электронов и водорода. Помимо участия в окислительно-восстановительном метаболизме, NAD

является субстратом для ряда регуляторных белков, контролирующих важнейшие механизмы жизнедеятельности клетки, такие как деацетилирование, моно- и поли-ADP-рибозилирование белков. Данные модификации белков играют важную роль в регуляции жизненно необходимых процессов в клетке, таких как экспрессия генов, правильное прохождение по клеточному циклу, секреция инсулина, репарация ДНК, апоптоз, старение и многие другие. NAD является предшественником метаболитов, участвующих в мобилизации кальция. Кроме того, известно, что нарушения регуляции уровня NAD в клетках могут быть связаны с развитием таких серьезных патологий, как пеллагра, нейродегенеративные заболевания и диабет. Таким образом, тема диссертационной работы В.А.Куликовой, посвященная изучению механизмов образования и транспорта основных предшественников NAD – нуклеозидов NR и NAR в клетках человека, несомненно, является актуальной.

Научная новизна диссертационного исследования Куликовой В.А. выражается в нескольких аспектах. Высокой новизной и практической значимостью обладает полученный в работе факт, что клетки млекопитающих могут выделять нуклеозид NAR, который выступает в роли предшественника NAD в соседних клетках, не способных использовать Nam и NA для синтеза NAD. Тем самым впервые показано, что одни клетки человека могут поддерживать эффективный синтез NAD в других клетках. А импорт нуклеозидов NR и NAR в клетки человека может осуществляться при помощи белков семейств ENT и CNT. Также в работе впервые описан для клеток человека механизм образования нуклеозидов NR и NAR путем дефосфорилирования мононуклеотидов NMN и NAMN 5'-нуклеотидазами.

Диссертационная работа Куликовой Вероники Алексеевны построена по традиционной схеме. Она состоит из введения, трех глав (а именно: литературного обзора, использованных в работе материалов и методов и полученных в работе результатов и их обсуждения), а также заключения, выводов, списка цитируемой литературы и списка сокращений и условных обозначений.

Диссертация написана понятным языком, изложение материала является достаточно строгим. Разделы диссертации имеют законченный характер. Диссертация обладает неким внутренним единством и содержит достаточное количество рисунков и таблиц, иллюстрирующих постановку задачи и получаемые результаты.

Во введении (Глава 1) автор обосновывает актуальность исследования, формулирует цели и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, характеризует новизну, теоретическую и практическую значимость результатов.

В обзоре литературы (Глава 2) подробно анализируются существующие сведения о роли NAD в метаболических и регуляторных процессах, а также подробно рассмотрены вопросы биосинтеза NAD и метаболизма нуклеотидов. Литературный обзор написан хорошим научным языком, позволяет представить современное состояние исследований той области науки, к которой относится диссертационная работа, и читается с интересом. Качество обзора не оставляет сомнений в высоком

профессионализме диссертанта.

В главе «Материалы и методы» (Глава 3) детально описаны используемые в работе методические подходы, среди которых очень широкий спектр методик, применяемых в разных областях современных биологических исследований: биохимии, биофизики, молекулярной и клеточной биологии.

В главе «Результаты и обсуждение» (Глава 4) приведены результаты работы и их обсуждение. Автором проведено комплексное исследование механизмов образования и взаимодействия внутри- и внеклеточных пулов таких ключевых метаболитов биосинтеза NAD, как рибозид никотинамида и рибозид никотиновой кислоты. С использованием метода ЯМР спектроскопии показано, что некоторые культивируемые клетки человека могут конвертировать никотиновую кислоту в рибозид никотиновой кислоты, который затем выходит из клеток в питательную среду. Описан возможный механизм образования нуклеозидов NR и NAR в клетках человека заключающийся в том, что белки CN-II и CN-III дефосфорилируют никатинамидмононуклеотид и мононуклеотид никотиновой кислоты до нуклеозидов NR и NAR как *in vitro,* так в культивируемых клетках человека. Установлено, что нуклеозиды NR и NAR могут не только поступать в организм с пищей, но и синтезироваться в клетках из других метаболитов NAD. Кроме того, на культурах клеток человека, продемонстрировано, что секретируемый в культуральную среду нуклеозид NAR, выступает в роли предшественника NAD в соседних клетках, не способных использовать Nam и NA для синтеза NAD, тем самым поддерживая эффективный синтез NAD в других клетках. Показано, что импорт нуклеозидов NR и NAR в клетки человека может осуществляться при помощи нуклеозидных переносчиков семейств ENT (от англ. equilibrative nucleoside transporters) и CNT (от англ. concentrative nucleoside transporters).

Имеются также разделы «Заключение» и «Выводы» (Глава 5 и 6), в которых перечислены основные результаты и сделаны необходимые выводы из этой работы.

В целом работа производит хорошее впечатление, однако, по существу работы можно сделать несколько замечаний:

1) Из обзора литературы у читателя может создаться неверное впечатление, что рассматриваемые в работе нуклеозиды NR и NAR являются минорными предшественниками NAD, в отличие от давно описанных Nam и NA. Такое, скорее всего, непроизвольное смещение акцентов в обзоре литературы необоснованно снижает значимость проводимых автором исследований. Кроме того, основным замечанием к этому разделу диссертации является отсутствие логического перехода от опубликованных данных по рассматриваемой проблеме к формулированию цели этого исследования. Однако это обстоятельство не снижает актуальности решаемых в работе задач.
2) Секция «Материалы и методы» в целом полно отражает весь широкий спектр использованных в работе методик. Однако при чтении, раздела 3.2.

«Культивирование клеток человека и трансфекция» возникают вопросы о целесообразности выбора именно этих клеточных линий человека, введенных в исследование, особенно учитывая разнообразные условия их культивирования (стр. 37).

3) В разделе «Результаты и обсуждение» (п. 4.1) представляются необходимыми, как минимум, дополнительные пояснения к наблюдаемому факту детекции NAR в кондиционированной среде (КС) клеток HEK293 при ко-трансфекции клеток двумя плазмидами. Эффективность трансфекции клеток млекопитающих является достаточно низкой, о чем автор работы сам упоминает при описании последующих экспериментов, а вероятность успешной двойной трансфекции, потенциально может быть, еще меньше. Тем не менее, полученные в работе данные ЯМР-анализа, несомненно, указывают на появление NAR в КС после двойной трансфекции. Этот факт требует дополнительного обсуждения. Кроме того, возникает вопрос о необходимости дополнительного контроля за возможностью образования NAR в КС из-за нарушения целостности клеток в процессе культивирования и проводимых процедур доставки генетических конструкций.
4) В работе показано что, в кондиционированной среде, полученной от клеток HeLa (стр.65), нуклеозид NAR обнаруживается без какого-либо дополнительного стимулирования его синтеза введением в клетки гиперэкспрессии соответствующих ферментов. Более того, автор предполагает, что возможно, клетки HeLa также выделяют и нуклеозид NR, (соответствующий ему сигнал на ЯМР-спектрограмме был на пределе уровня детекции). В разделе «Результаты и обсуждение» кажется уместным провести активное обсуждение возможных причин таких значительных различий между культурами клеток, использованными в работе (стр.43-46). В целом, основным недостатком главы «Результаты и обсуждение» представляется именно, недостаточное, зачастую сведенное к минимуму, обсуждение полученных разнообразных и, несомненно, значимых результатов.

Имеются и другие, менее существенные замечания, к которым в основном относятся редкие опечатки и неточности, впрочем, характерные для любой большой печатной работы. Раздел «Обзор литературы» слегка переполнен данными не имеющими непосредственного отношения к работе, что затрудняет чтение, не позволяя сконцентрироваться на основной проблеме исследования диссертанта. Кроме того, работа несколько «перегружена» сокращениями, список которых плохо систематизирован.

Высказанные замечания не снижают общего положительного впечатления от диссертации. А достоверность результатов этой работы, несомненно, подтверждается тем, что они были опубликованы в международных высоко рейтинговых научных журналах и неоднократно представлены на профильных семинарах и конференциях.

В целом диссертационная работа, написанная Куликовой В.А., является завершенным научным исследованием, выполненным на высоком теоретическом и экспериментальном уровне и производит хорошее впечатление. Публикации по теме диссертационной работы полностью отражают ее содержание. А отмеченные недостатки, на мой взгляд, не умаляют достоинств работы. Результаты работы обладают высокой научной актуальностью, новизной и потенциально имеют значительную практическую значимость. Считаю, что диссертация представленная В.А. Куликовой удовлетворяет требованиям, предъявляемым к диссертациям (пункты 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013г.), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Отзыв на диссертацию обсужден на Ученом совете Отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ 29 ноября 2017 г., протокол № 94.

Отзыв подготовил
старший научный сотрудник
Отделения молекулярной и
радиационной биофизики
НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ,
к.б.н.

Т.А. Штам
Shtam_ta@pnpi.nrcki.ru

Зам. руководителя Отделения молекулярной и
радиационной биофизики
НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ,
д.б.н.

В.Н.Вербенко
verbenko_vn@pnpi.nrcki.ru

Ученый секретарь Отделения молекулярной
и радиационной биофизики
НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ,
к.ф.-м.н.

К.А. Шабалин
shabalin_ka@pnpi.nrcki.ru

Контакты ведущей организации:
ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
188300, Ленинградская область, г. Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1
Тел.: +7 (81371) 460-25, E-mail: dir@pnpi.nrcki.ru