

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
доктора медицинских наук, профессора,
заведующего кафедрой биохимии федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего образования
«Саратовский государственный
медицинский университет имени В.И. Разумовского»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Владимира Борисовича Бородулина
на диссертационную работу Кузьмичевой Валерии Игоревны на тему
«Структурно-функциональный потенциал лактата в регуляции
межмолекулярных взаимодействий», представленную в
диссертационный совет Д 208.038.02 на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук по специальности
03.01.04 – биохимия

Актуальность темы исследования

В последнее десятилетие произошло выделение новых ответвлений молекулярной медицины, среди которых особого внимания заслуживает митохондриальная и биоэнергетическая. В соответствии с постулатами этой науки, управление биохимическими потоками внутри клетки может оказывать воздействие на ее биоэнергетический статус. Данный факт имеет большое значение, поскольку, влияя на патологические процессы до развития основного заболевания, мы можем восстановить энергетический потенциал клетки, обратив вспять ассоциированные с заболеванием молекулярные изменения. В данном аспекте особого внимания заслуживают интермедиаты, постоянные участники биохимических превращений, способные переключать анаболические и катаболические пути.

Выбранная диссертантом молекула для исследования – лактат, может быть по праву отнесена к ключевым метаболитам нашего организма. Несмотря на то, что биохимическая роль лактата считалась хорошо изученной и широко представленной в литературе, данных о неканонических эффектах этого соединения за рамками биохимических процессов представлено недостаточно. Долгое время пласт взаимодействий между молекулами с малой молекулярной массой и более крупными структурами

(белками, гормонами, клеточными рецепторами) оставался неизученным. Вместе с тем, последняя декада стала временем активного изучения этой проблемы. Благодаря появившемуся исследованиям стало понятно, что некоторым метаболитам присущи функции, приравнивающие их к классу сигнальных молекул на основе способности к регуляции различных процессов, в частности, белок-белкового взаимодействия. Определение места и функциональных возможностей лактата в контексте влияния на протеом и метаболом человека представляется актуальной задачей.

Новизна исследования

Впервые установлено, что эндогенный интермедиат лактат способен влиять на белок-белковое взаимодействие, что было доказано на примере реакции антиген-антитело с применением экспериментальной системы групп крови АВ0. Антигенные детерминанты проявляют различную чувствительность к введению лактата: степень ответа гликопротеина А превосходит таковую гликопротеина В. Установлено увеличение времени начала вступления в реакцию агглютинации антигенов эритроцитов с естественными и моноклональными антителами под влиянием лактата.

Предложено использование метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для визуализации белок-лигандного взаимодействия антиген-антитело в условиях влияния лактатом с целью количественной оценки результатов взаимодействия.

Впервые описано изменение конформационной устойчивости лактатдегидрогеназы при влиянии оксалоацетата. Низкие концентрации оказывают протекторное действие на конформацию лактатдегидрогеназы, что выражается в увеличении ее термостабильности. Высокие концентрации оказывают дестабилизирующее влияние на конформацию, снижают термостабильность лактатдегидрогеназы. Наблюдаемые эффекты сопровождаются изменением функциональной активности белка: низкие концентрации оксалоацетата оказывают активирующее влияние на лактатдегидрогеназу, более высокие – ингибирующее.

Практическая значимость и научная ценность

Разработанные диссертантом экспериментальные модели для изучения влияния лактата и оксалоацетата на белковые структуры могут быть применены для любых низкомолекулярных органических соединений (лекарственных препаратов, гормонов). В частности, предложен способ оценки влияния низкомолекулярных лигандов на аффинитет связи белок-лиганд (патент № 2680408 от 21.02.2019 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на аффинитет белок-лигандной связи») и подход для количественной оценки конформационных изменений, вызванных малой молекулой (патент №2698628 от 13.06.2019 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на конформацию белка»).

С практической точки зрения, необходимо учитывать способность лактата оказывать модифицирующее влияние на различные биологические процессы, что особенно важно при проведении анализов у пациентов в состоянии, сопровождающемся гиперлактатемией. 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

Представленная диссертантом работа была разделена на три этапа и включала применение большого количества разнообразных современных методик. На первом этапе было проведено компьютерное моделирование биологической активности лактата с применением двух программ (PASS и STITCH), перекрестное моделирование повышает качество и достоверность результатов, снижая вероятность разночтений и ложных выводов.

Второй этап исследования был выполнен на достаточном объеме клинического материала: проводилось определение групповой

принадлежности крови по системе АВ0, а также определение содержания лактата, пирувата, активности лактатдегидрогеназы у 210 клинически здоровых добровольцев, с последующим изучением влияния лактата на антигенные детерминанты А и В групп крови АВ0.

Третий этап выполнялся с применением индивидуального высокоочищенного монокаталитического белка лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) и оксалоацетата (Sigma Aldrich, США) на высокотехнологичном оборудовании Monolith NT и Prometheus NT (Nano Temper, Германия).

Примененные методы статистической обработки способствуют репрезентативному представлению материала, наравне с классическими подходами большое внимание уделено построению математической модели, описывающей процесс температурной деградации каталитического белка лактатдегидрогеназы в комплексе с различными концентрациями оксалоацетата. Кроме того, проведен дополнительный анализ участка полученной кривой плавления для определения степени влияния оксалоацетата при физиологическом диапазоне температур.

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 задачи, отличающийся полученными новыми знаниями, развивающий существующую систему научных знаний.

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 (акты внедрения результатов диссертационной работы, патенты) и состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы, иллюстрирована 12 таблицами и 47 рисунками.

Обзор литературы по проблеме исследования включает три подраздела, изложен на 41 странице. Он характеризуется высоким уровнем информативности, шириной и глубиной проработки материала по вопросам влияния низкомолекулярных соединений на различные физиологические и патологические процессы, главным образом уделяя внимание значению интермедиата лактата и лактатдегидрогеназной каталитической системы, а также возможностям компьютерного моделирования биологической активности молекул.

Глава вторая «Материалы и методы» включает грамотное, подробное описание этапов исследования, описание биохимических, иммуногематологических, оптических и флуоресцентных методов исследования, а также методов обработки полученных результатов. Обращает на себя внимание достаточная иллюстрированность схемами и рисунками автором этого раздела, что делает доступным для понимания дизайн представленного исследования.

Главы с третьей по пятую, содержащие результаты собственных исследований, изложены на 67 страницах. В них автор последовательно описывает результаты моделирования *in silico*, с определением последующих интересующих белковых мишеней, изучает влияние низкомолекулярного лиганда на белок-белковое взаимодействие сначала с применением экспериментальной модельной системы групп крови АВ0, а затем с использованием индивидуального высокоочищенного каталитического белка лактатдегидрогеназы. Следует отметить, что выбранная автором система изложения материала и ее порядок являются логичными и способствуют пониманию изучаемого вопроса, а аналитические способности автора реализуются в полной мере при построении математической модели плавления лактатдегидрогеназы.

Представленные диссертантом выводы является итогом проделанной работы. В них суммированы и проанализированы результаты клинических

исследований, сделанные заключения соответствуют поставленным целям и задачам диссертационного исследования.

Указатель литературы содержит 342 источника, из которых 41 отечественных и 301 зарубежных авторов. В целом заключение является логически завершенным представлением результатов исследования.

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 клинко-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.

- 1.Что Вы понимаете под процессом плавления белковой молекулы?
- 2.Как Вы объясните разнонаправленное взаимодействие лактата с поверхностными гликопротеинами эритроцитов А и В?
- 3.Как автор объясняет изменение активности лактатдегидрогеназы под влиянием различных концентраций оксалоацетата?

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 темы, 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.

Заведующий кафедрой биохимии
федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Саратовский государственный
медицинский университет имени В.И. Разумовского»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук,
профессор

Бородулин Владимир Борисович

специальность 03.01.04 – биохимия

Подписи

ЗАВЕРЯЮ:

Начальник ОК СГМУ

410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112, телефон (845-2)-27-33-70
E-mail: borodulinvb@mail.ru

24.04.2020

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте диссертации Кузьмичевой Валерии Игоревны на тему: «Структурно-функциональный потенциал лактата в регуляции межмолекулярных взаимодействий» на соискание учёной степени кандидата медицинских наук 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, (861)2625018).

№	Фамилия Имя Отчество рецензента	Год рождения, гражданство	Место основной работы (название организации, ведомство, город, занимаемая должность)	Учёная степень (шифр специальности, по которой присуждена учёная степень в соответствии с действующей Номенклатурой специальностей научных работников, № свидетельства)	Учёное звание	Шифр специальности (отрасли науки) в диссертационном совете (с указанием отраслей; соответствующего периода; отраслей и сфер деятельности)
1	2	3	4	5	6	7
1	Бородулин Владимир Борисович	1960, РФ	федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой биохимии	Доктор медицинских наук, 03.01.04 – биохимия	профессор	
Общее число цитирований в РИНЦ - 512, Индекс Хирша - 10						
а) Перечень научных публикаций в издания, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах			1. Biological activity of organoselenium compounds in heavy metal intoxication/ Rusetskaya N.Y., Borodulin V.B.// Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry. 2015. Т. 9. № 1. С. 45-57. Импакт фактор – 0,44 2. Биологическая активность селеноорганических соединений при интоксикации солями			

<p>данных Web of Science и Scopus, а также в специализированных профессиональных базах данных Astrophysics, PubMed, Mathematics, Chemical Abstracts, Springer, Agris, GeoRef, MathSciNet, BioOne, Compendex, CiteSeerX.</p>	<p>тяжелых металлов/ Русецкая Н.Ю., Бородулин В.Б.// Биомедицинская химия. 2015. Т. 61. № 4. С. 449-461.Импакт фактор – 1,07</p> <p>3. Hemostasis parameters and toxic effects of 3-substituted and condensed chromen-2-ones (coumarins)/ Ibragimova D.N., Fedotova O.V., Ozerova A.G., Koftin O.V., Borodulin V.B., Samokhvalov V.A.// Pharmaceutical Chemistry Journal. 2018. Т. 51. № 12. С. 1053-1056. Импакт фактор – 0,55</p> <p>4. Соединения селена в редокс-регуляции воспаления и апоптоза/ Русецкая Н.Ю., Федотов И.В., Кофтина В.А., Бородулин В.Б.// Биомедицинская химия. 2019. Т. 65. № 3. С. 165-179. Импакт фактор – 1,006</p>
<p>б) Перечень научных публикаций в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук, с указанием импакт-фактора журнала на основании данных библиографической базы данных научных публикаций российских учёных - Российскому индексу научного цитирования (РИНЦ).</p>	<p>1. Показатели эндотоксикоза в крови крыс с лимфосаркомой плисса при введении наночастиц железа/ Горошинская И.А., Качесова П.С., Бородулин В.Б., Немашкалова Л.А., Лосев О.Э., Чудилова А.В.//Успехи современного естествознания. 2015. № 9-2. С. 303-307. Импакт фактор –0,279</p> <p>2. Влияние наночастиц железа на состояние свободнорадикальных процессов в крови крыс с фибросаркомой при различном противоопухолевом эффекте/ Горошинская И.А., Качесова П.С., Бородулин В.Б., Немашкалова Л.А.// Фундаментальные исследования. 2015. № 7-1. С. 9-13. Импакт фактор –0,440</p> <p>3. Параметры гемостаза и токсического эффекта 3-замещенных и конденсированных хромен-2-онов (кумаринов)/ Ибрагимова Д.Н., Федотова О.В., Озерова А.Г., Кофтин О.В., Бородулин В.Б., Самохвалов В.А.// Химико-фармацевтический журнал. 2017. Т. 51. № 12. С. 7-10. Импакт фактор –0,819</p> <p>4. Биологическое действие наночастиц металлов в сочетании с синтетическими пептидами на клинические штаммы микроорганизмов/ Бородулин В.Б., Бабушкина И.В., Бородулина Е.В., Бобылева Е.В., Лосев О.Э., Чеботарева Е.Г.// Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2018. Т. 14. № 2. С. 5-11. Импакт фактор –0,435</p>

5. Исследование биомаркеров тканевого повреждения почек у больных оксалатным уролитиазом после трансуретральной контактной уретеролитотрипсии/ Масальцев А.К., Бородулин В.Б.// Патогенез. 2019. Т. 17. № 2. С. 62-69. Импакт фактор –0,471

Официальный оппонент:
заведующий кафедрой биохимии
федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Саратовский государственный медицинский
университет имени В.И. Разумовского»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор

В.Б. Бородулин

Подпись заверяю:

10.03.2020

Подписи
ЗАВЕРЯЮ:
Начальник ОК СГМУ