

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 Колотьевой Наталии Александровны на
тему «Малые молекулы – переключатели обмена веществ»,
представленную в диссертационный совет Д 208.038.02 на соискание
ученой степени доктора медицинских наук по специальности
03.01.04 – биохимия

Актуальность темы исследования

В настоящее время существует потребность в фундаментальных исследованиях, изучающих роль естественных интермедиатов – переключателей обмена веществ. Малые молекулы составляют большинство клеточных молекул. Их внутриклеточные концентрации варьируют в широком диапазоне, и они участвуют в самых разнообразных биохимических процессах. Долгое время взаимодействия между молекулами с малой молекулярной массой и более крупными структурами (белками, гормонами, клеточными рецепторами) оставались неизученными. Вместе с тем, благодаря появившемуся в последнее десятилетие 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, фермент-субстратного взаимодействий. Определение места и функциональных возможностей пирувата, лактата, оксалоацетата и малата в контексте влияния на протеом и метаболизм человека представляется актуальной задачей. Как изучить характер межбелковых взаимодействий в максимально приближенных к внутренней среде организма условиях? Какие объекты, новые методы и экспериментальные приемы для этого использовать? Как провести

количественный анализ и возможна ли визуализация данных процессов с помощью высокотехнологичных и доступных методов исследования? Ответы на эти вопросы и попытался дать в своей работе диссертант, чем и определяется актуальность данного исследования.

Структура и содержание диссертационного исследования

Структура диссертации Н.А. Колотьевой традиционна и соответствует современным стандартам работ такого уровня. Она состоит из шести глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы исследования, в которых логично за счет решения поставленных задач складывается система знаний по данной проблеме.

Обзор литературы состоит из шести подразделов, которые посвящены изучению межмолекулярных взаимодействий, в частности, анализу литературных данных по основным переключателям обмена веществ – глицерофосфату и диоксиацетонфосфату, пирувату, лактату, оксалоацетату и малату, а также ферментам, участвующим в этих процессах – глицерофосфатдегидрогеназе, лактатдегидрогеназе, малатдегидрогеназе. Диссертантом выстроена четкая логическая цепь с момента открытия изучаемых малых молекул, дальнейшего изучения их метаболизма в организме в норме и при различной патологии до анализа современного состояния вопроса, характеризующегося более детальным изучением лигандной роли естественных интермедиатов и функционированием глицерофосфатдегидрогеназной, лактатдегидрогеназной, малатдегидрогеназной каталитических систем. Завершается обзор литературы актуальными сведениями о возможностях применения и перспективах биоэнергетической и митохондриальной медицины.

Во второй главе – данные об использованных современных высокоинформативных методах биохимического, иммуногематологического, анализа, а также о впервые использованных для количественной оценки межбелковых взаимодействий лазерной сканирующей конфокальной

микроскопии, факта взаимодействия белка и естественного интермедиата - микрокапиллярного термофореза и оценки термоллабильности белка - дифференциальной сканирующей флуориметрии. Для оценки влияния малых молекул на межмолекулярные процессы *in vivo* была использована клеточная культура дермальных фибробластов. Необходимо отметить достаточно большой объем исследований. Использование пакета современных компьютерных программ статистической обработки позволило автору получить и анализировать достоверные данные. В главах, где представлены результаты проведенных диссертантом исследований, последовательно решаются поставленные задачи, позволяющие прийти к обоснованным выводам и рекомендациям.

В третьей и четвертой главе проведен анализ компьютерного моделирования биологической активности оксалоацетата, малата, лактата и пирувата в среде PASS, и определение их потенциальных белковых партнеров в программе STITCH. Использование технологии компьютерного моделирования помогло выделить наиболее вероятные и значимые эффекты и связи с другими молекулами, что позволило сформировать целостное представление о множественных и разнонаправленных эффектах изучаемых метаболитов. Это позволило автору рассматривать оксалоацетат, малат, пируват и лактат не только как регулятор базовых метаболических путей, но и предположить роль данного интермедиата в процессах межмолекулярного взаимодействия в качестве молекул, несущих определенный информационный потенциал благодаря своим физико-химическим свойствам. В этом направлении диссертант и продолжил свои исследования, результаты которых представил далее.

Для дальнейших экспериментов *in vitro* с целью изучения влияния пирувата и лактата на белок-белковые взаимодействия была выбрана модель антиген-антительного взаимодействия - система групп крови АВ0 (гликопротеинов А и В, естественных антител). В различных модельных системах с антигенами А и В, естественными антителами показана

способность пирувата и лактата участвовать в процессах образования белок-белковых комплексов. Установлено, что введение пирувата и лактата в экспериментальную систему приводит к замедлению начала вступления антигенов А и В в реакции агглютинации. Благодаря наличию специфичных флуоресцентных антител к групповым антигенам диссертант смог провести визуализацию образования и количественную оценку комплексов антиген-антитело с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. При введении изучаемых интермедиатов полученные данные свидетельствуют об увеличении процесса агрегации и различным характером образующихся комплексов. Возможно, это обусловлено разнообразными конформационными перестройками детерминант А- и В-антигенов, отличающихся по своему химическому строению. Гликопротеин А, терминальный углеводный фрагмент которого представлен N-ацетилгалактозамином, показывает большую чувствительность к лактату, чем пирувату, что проявляется в большем увеличении времени начала агглютинации по сравнению с гликопротеином В с терминальным моносахаридом D-галактозой.

Следующим шагом в изучении воздействия окислительно-восстановительных пар метаболитов пируват – лактат и малат - оксалоацетат на белковые структуры автором было выбрано проведение экспериментов с участием чистых каталитических белков глицерофосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.8) и лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) фирмы Sigma.

Четвертая глава содержит данные о результатах взаимодействия малых молекул и двух каталитических белков: лактатдегидрогеназы и глицерофосфатдегидрогеназы, изученных методами микрокапиллярного термофореза и дифференциальной сканирующей флуориметрии. Диссертантом установлен факт взаимодействия пирувата, лактата, малата и оксалоацетата с лактатдегидрогеназой и глицерофосфатдегидрогеназой, рассчитана константа диссоциации и

показано дозозависимое влияние малых молекул на стабильность ферментов при воздействии температурного фактора.

Пятая глава посвящена изучению влияния естественных метаболитов на фермент-субстратное взаимодействие глицерофосфатдегидрогеназной и лактатдегидрогеназной каталитических систем. Автором сделан основной и важный вывод об участии изучаемых малых молекул во внутри- и межклеточных взаимодействиях, в частности, белок-белковых и фермент-субстратных изолированных системах. Вместе с тем, остались вопросы, ответы на которые помогло дать расширение методологических возможностей постановки экспериментальных работ и использование клеточных технологий. Следующим этапом диссертант изучал регуляторное влияние малых молекул *in vivo* на культуру клеток.

В шестой главе отображены молекулярные изменения метаболического профиля, ферментативной активности и жизнеспособности дермальных фибробластов под воздействием биологически активных соединений, проанализированные в лизате клеток и внеклеточной среде - надосадочной жидкости. Полученные данные свидетельствуют о возможности интермедиатов проявлять регуляторную роль и эффективно модулировать энергетические потоки клетки, сохраняя внутренний гомеостаз и даже оптимизируя метаболизм под влиянием внешних факторов.

В целом, диссертация изложена на 297 страницах, иллюстрирована 37 рисунками, содержит 31 таблицу. В работе использовано 453 источника, из которых 51 отечественный и 402 зарубежных авторов.

Практическая значимость и научная ценность

С использованием методов компьютерного моделирования получены сведения о возможной биологической активности пирувата, лактата, оксалоацетата и малата и установлены их вероятные белковые партнеры для межмолекулярных взаимодействий, что обусловлено химической структурой изучаемых малых молекул.

С целью изучения характера белок-белковых взаимодействий использованы новые методические приемы. Получены ранее неизвестные данные, раскрывающие особенности взаимодействия комплексов антиген-антитело на примере межмолекулярной модели групп крови АВ0, а также естественных антител при внесении в экспериментальную систему пирувата и лактата. Выявлена разнонаправленность действия пирувата и лактата на антигены А и В, естественные антитела к введению малых молекул.

Впервые использовался метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для визуализации антиген-антительных комплексов в условиях влияния пирувата и лактата с последующей количественной оценкой результатов взаимодействия.

Впервые получены данные, описывающие изменение конформационной устойчивости каталитических белков глицерофосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы в температурном градиенте при добавлении пирувата, лактата, оксалоацетата и малата, предложен новый подход для количественной оценки вызванных малыми молекулами изменений.

Впервые описано протекторное воздействие низких концентраций биологически активных соединений. Показано, что оксалоацетат и малат в 1 мкМ конечной концентрации увеличивает активность лактатдегидрогеназы, при увеличении концентрации метаболитов наблюдается дозозависимое ингибирующее воздействие на каталитическую систему.

С практической точки зрения, полученные данные позволяют учитывать возможные искажения результатов анализа в крови при повышенном уровне минорных компонентов метаболизма при постановке чувствительных высокотехнологичных методов (иммуноферментный, иммунофлуоресцентный, иммуногематологический).

Научная новизна исследования подтверждается тремя зарегистрированными патентами (патент № 2680408 от 21.02.2019 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на аффинитет белок-лигандной связи»; патент №2698628 от 13.06.2019 «Способ

выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на конформацию белка»; патент № 2484480 от 10.06.2013 «Способ оценки действия биологически активных веществ на антиген-антительное взаимодействие») и одним свидетельством о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2010611397 от 17.02.2012. Программа для импорта данных, полученных с биохимического анализатора CobasIntegra 400 Plus.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации

Методический уровень работы высокотехнологичен, включает в себя комплекс методов – иммуногематологические, биохимические, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, микрокапиллярный термофорез, дифференциальная сканирующая флуориметрия, клеточная культура. Сравнительная статистическая обработка полученных результатов обеспечивает объективность и достоверность оценки данных исследования. Представленные в работе сведения тщательно документированы, они наглядно иллюстрированы таблицами и рисунками.

В процессе обстоятельного обсуждения полученных данных соискатель выдвинул ряд вполне обоснованных оригинальных положений, важных как в научном, так и в практическом отношении. Выводы научно обоснованы и логично вытекают из материалов исследования. Автором проведено исследование влияния пирувата, лактата, оксалоацетата и малата на белок-белковые, фермент-субстратные взаимодействия с целью доказать их влияние на функциональные группы белков и как результат их дальнейшие конформационные перестройки, реализующиеся в изменении характера межмолекулярных взаимоотношений в процессах как *invitro*, так и *invivo*.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедре фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой, кафедре общей и молекулярной биологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ, а также нашли практическое применение в работе клинико-диагностических лабораторий клиник ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ, ГБУЗ СОКБ им. В.Д. Середавина, Институте экспериментальной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ.

Подтверждение публикаций по теме диссертации

Основные результаты достаточно полно отражены в имеющихся публикациях. По материалам диссертационной работы издано 43 публикаций, в том числе 19 статей, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК РФ и приравненных к ним публикаций, 7 статей в международных реферативных базах SCOPUS и WebofScience, получены 3 патента.

Замечания

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.

В ходе ознакомления с диссертацией и авторефератом возникли вопросы:

1. Известно, что раствор малых молекул имеет кислую реакцию среды. Не вызвала ли выбранная вами концентрация лактата и пирувата сдвиг рН среды в проведенных экспериментах?

2. Совпадают ли данные агглютинации с методом визуализации белок-белковых взаимодействий методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии? Как Вы можете объяснить разнонаправленное влияние пирувата и лактата на гликопротеины А и В?
3. Учитывая структурно-функциональный потенциал изучаемых Вами молекул, как они влияют на каталитические белки глицерофосфатдегидрогеназу и лактатдегидрогеназу? Прослеживается ли влияние кето- или окси- кислот?
4. Дайте, пожалуйста, пояснение принципов методов микрокапиллярного термофореза и дифференциальной сканирующей флуориметрии, их применение? На какие вопросы помогло ответить применение этих технологий?

Заключение

Диссертационная работа Колотьевой Наталии Александровны "Малые молекулы – переключатели обмена веществ", является завершенной научно-квалификационной работой, посвящённой решению фундаментальной задачи по изучению влияния малых молекул пирувата, лактата, оксалоацетата и малата на белок-белковые, фермент-субстратные взаимодействия, что расширяет существующие представления об участии лигандов с низкой молекулярной массой на процессы межмолекулярного узнавания с белковыми молекулами и раскрытию природы этих взаимоотношений.

Диссертация Колотьевой Н.А. по своей форме, методам исследования, научному содержанию, актуальности изучаемой темы, объёму 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 докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора 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
специальность 03.01.04 – биохимия

Бородулин Владимир Борисович

Подпись заверяю:
Начальник отдела кадров

И.В.Веточкина



06.04.21

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

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте диссертации Колотьевой Наталии Александровны на тему: «Малые молекулы – переключатели обмена веществ» на соискание учёной степени доктора 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 -606, Индекс Хирша - 10						
а) Перечень научных публикаций в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных Web of Science и Scopus,			<ol style="list-style-type: none"> 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 тяжелых металлов/ Русецкая Н.Ю., Бородулин В.Б.// Биомедицинская химия. 2015. Т. 61. 			

<p>атакже в специализированных профессиональных базах данных Astrophysics, PubMed, Mathematics, ChemicalAbstracts, Springer, Agris, GeoRef, MathSciNet, BioOne, Compendex, CiteSeerX.</p>	<p>№ 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 оксалатнымуролитиазом 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

Подпись заверяю:
Начальник отдела кадров


В.Б. Бородулин


И.В. Веточкина

Подписи

ЗАВЕРЯЮ:

Начальник ОК СГМУ



16.02.21