

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Колотьевой Наталии Александровны «Малые молекулы – переключатели обмена веществ», представленную в специализированный диссертационный совет Д 208.038.02 на базе ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ РФ к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 - биохимия

Актуальность исследования

Нередко внимание исследователей в молекулярной биологии, биохимии, фармакологии и других научных отраслях привлекают низкомолекулярные вещества, так называемые «малые молекулы», обладающие биологической активностью, то есть способностью регулировать те или иные биологические процессы. Эти вещества, прежде всего, являются мономерами биополимеров - аминокислотами, моносахаридами, нуклеотидами, жирными кислотами. К ним также относятся витамины, АТФ и другие макроэргические соединения. Многие из них играют важную роль в метаболических процессах, участвуя в осуществлении биохимических реакций.

Исследование малых молекул приобретает новое звучание в связи с появлением постгеномных технологий, которые используются в разработке биомаркеров и таргетных препаратов. Протеомика и метаболомика позволяют одновременно выявить комплекс присутствующих белков и набор метаболитов в клетках или в биологических жидкостях, но при этом нарастает количество вопросов о возможных межбелковых взаимодействиях или функционально значимых контактах индивидуальных белков с метаболитами. Именно это определяет актуальность представленной диссертационной работы, целью которой является изучение влияния естественных метаболитов на белок-белковые и фермент-субстратные взаимодействия. Метаболическими объектами для установления их регуляторных

возможностей автором выбраны представители универсального энергетического пути, а именно, пируват, лактат, оксалоацетат, малат, а мишенями их влияния – ферменты глицерофосфатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа и способность взаимодействия антигенов с антителами.

Для достижения поставленной цели сформулировано 6 взаимосвязанных между собой задач, имеющих теоретическую и, в меньшей мере, практическую направленность.

Степень достоверности и новизна результатов исследования

Диссертационная работа представляет собой комплексное с методической точки зрения исследование. Его дизайн сформирован детально и логично. Для получения достоверных результатов применен междисциплинарный подход. Помимо универсальной статистической обработки данных и микрокапиллярного термофореза взаимодействия каталитических белков использованы компьютерное моделирование биологической активности малых молекул, лазерная дифференциальная сканирующая флуориметрия, конфокальная микроскопия и клеточная культура фибробластов. Следует отметить, что все разделы исследования выполнены в лабораториях высокого уровня, включая лабораторию молекулярной и радиационной биофизики Петербургского университета ядерной физики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Безусловную новизну определяет многостороннее комплексное изучение главных объектов исследования – малых молекул, что соответствует и статусу работы как докторской диссертации.

Новизной обладают данные об особенностях межмолекулярного взаимодействия белков группы крови АВ0 и антител под влиянием малых молекул - пирувата и лактата с использованием нового подхода для визуализации белковых комплексов, а именно, лазерной сканирующей микроскопии с последующей количественной оценкой результатов взаимодействий. Также впервые был использован метод дифференциальной

сканирующей флуориметрии для изучения конформационных особенностей каталитических белков под влиянием различных концентраций малых молекул в температурном градиенте, позволивший выявить термозависимый эффект в структуре молекул лактатдегидрогеназы и глицерофосфатдегидрогеназы.

Весьма убедительными являются полученные данные о метаболическом профиле супернатанта и лизата дермальных фибробластов человека при культивировании с пируватом, лактатом, оксалоацетатом и малатом, свидетельствующие о стимулирующем действии оксалоацетата и малата на клеточную культуру, основанном на увеличении параметров жизнеспособности клеток.

Новизну полученных результатов подтверждают 4 патента, полученные на способы объективной оценки вышеописанных влияний биологически активных веществ на антиген-антительное взаимодействие и конформацию белков.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Основные положения работы объективны и обоснованы знанием объекта изучения, опирающимся на литературные данные, грамотным анализом материалов диссертации. Новизна полностью отражена в научных положениях, выносимых автором на защиту, и выводах.

В каждой части экспериментального исследования были использованы адекватные поставленным задачам биохимические, иммунологические, спектрометрические методы исследования, а также лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, дифференциальная сканирующая флуориметрия, капиллярный термофорез и культура клеток. Это позволило провести:

1. Компьютерное моделирование прогнозируемой биологической активности в программе Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) и определение потенциальных белковых партнеров взаимодействия для малых молекул в системе Search Tool for Interacting Chemicals (STITCH)

2. Анализ функционирования модели антиген–антитело системы АВ0 крови под влиянием естественных метаболитов.
3. Визуализацию белок-белкового взаимодействия и количественную оценку влияния малых молекул на белковые комплексы.
4. Изучение конформационных особенностей каталитических белков под влиянием температурного фактора в присутствии малых молекул.
5. Оценку функционирования фермент-субстратной системы под влиянием малых молекул в различном диапазоне концентраций.
6. Эксперимент с культурой клеток фибробластов в присутствии пирувата, лактата, оксалоацетата, малата.

Все перечисленное говорит о добротности и высоком качестве выполненного исследования.

В статистической обработке полученных данных были применены специальные программы для каждого блока исследований. Среди них были MS EXCEL 2016 с последующим статистическим анализом в пакете прикладных программ SPSS 12.0 (IBM SPSS Statistics, США), непараметрический анализ с использованием медианы, нижнего и верхнего квартиля, квартильного размаха, однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующими апостериорными сравнениями с контролем либо между всеми возможными комбинациями попарных сравнений из изученных семи концентраций по критерию Даннетта и другие. Таким образом, научные положения и выводы аргументированы статистическими характеристиками.

Обоснованные выводы соответствуют поставленным задачам и полностью вытекают из полученных результатов.

Практические рекомендации логичны и представляют собой описание возможностей использования полученных результатов в научных исследованиях и в лабораторной диагностике с определением конкретных путей их реализации.

Положения диссертационной работы, выносимые на защиту, полностью отражают результаты и выводы.

Научная и практическая значимость результатов исследования

Полученные результаты экспериментального исследования *in silico* и *in vitro* способствуют расширению представлений о биологической активности пирувата, лактата, малата, оксалоацетата, о белковых партнерах взаимодействия этих малых молекул, возможности малых молекул оказывать регуляторное воздействие на белковые структуры.

Практическая значимость фундаментального исследования заключается, прежде всего, в ее возможной континуальности с использованием апробированных или разработанных подходов к изучению объекта исследования. В данном случае это запатентованные способы объективной оценки влияния малых молекул как регуляторных метаболитов на конформацию белков и межбелковые взаимодействия, что может быть очень востребовано в фармацевтической отрасли и в медицине в целом.

Внедрение результатов проведенных исследований

В связи с фундаментальным характером диссертационного исследования его научные положения используются в учебном процессе на кафедре фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой, кафедре общей и молекулярной биологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ.

Практические рекомендации по влиянию низкомолекулярных метаболитов, находящихся в биологических средах, на результат высокочувствительных иммунологических методов 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.

Целесообразно издание методических материалов по теме диссертации.

Степень завершенности исследования и качество оформления диссертации

Диссертация Колотьевой Н.А. представляет собой законченный труд,

изложенный на 299 страницах компьютерного текста, имеет общепринятую структуру и порядок изложения материала: состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка литературы, приложений. Работа написана профессиональным языком, уместно иллюстрирована 31 таблицей и 37 рисунками. Библиографический список включает 453 источника, из которых 51 отечественный, 402 зарубежных.

Введение содержит все необходимые для ознакомления с работой характеристики: актуальность выбранной темы, степень разработанности темы исследования, обоснование поставленной цели и задач для ее достижения, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, положения, выносимые на защиту, информацию об апробации диссертации и другие характеристики выполненного исследования.

Большой объем литературного обзора (59 стр), вероятно, объясняется несколькими объектами исследования и широтой поставленных задач, поэтому он написан с привлечением многочисленных литературных источников как отечественных, так и зарубежных авторов. Диссертантом проанализированы уже имеющиеся данные о межмолекулярных взаимодействиях макромолекул и малых молекул, об изучаемых метаболитах, их роли в метаболических процессах.

Во второй главе автором приводится информация об использовании комплекса методов исследования для получения ответа на поставленные вопросы, включая программы для компьютерного моделирования и статистической обработки полученных результатов.

Собственным исследованиям посвящены четыре главы на 115 страницах, каждая из которых представляет собой самостоятельное исследование по решению отдельной задачи. Глава 3 содержит информацию об особенностях белок-белковых взаимодействий в присутствии низкомолекулярных соединений на модели гликопротеинов групп крови АВ0

системы; в 4-й и 5-й главах описаны конформационные и функциональные изменения глицерофосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы при взаимодействии с пируватом, лактатом, оксалоацетатом и малатом; в 6-й - особенности протекания метаболических процессов в культуре фибробластов при инкубации с малыми молекулами.

Затем представлены заключение, выводы и практические рекомендации. Все главы прекрасно иллюстрированы таблицами, рисунками и микрофотографиями, подтверждающими достоверность результатов проведенного исследования и обоснованность последующего анализа и выводов.

Анализ и обсуждение результатов последовательного решения поставленных задач дан в заключении на 25 страницах. В лаконичной форме изложена суть каждого этапа исследования и оценка его результатов.

В программе STITCH были получены данные, согласующиеся с предсказанными системой PASS молекулярными механизмами действия и фармакологическими эффектами пирувата, лактата, оксалоацетата и малата. Предположение об их влиянии на один из ключевых механизмов организма – белок-белковое взаимодействие - было проверено в серии экспериментов *in vitro* на взаимодействии антигенов с антителами молекул гликопротеинов А и В и естественных иммуноглобулинов системы АВ0 в условиях преинкубации с растворами пирувата и лактата, в результате чего было установлено влияние пирувата и лактата на белок-белковое взаимодействие молекулярной модели групп крови АВ0. Эти и другие выявленные эффекты малых молекул как биологически активных метаболитов резюмированы в 10 выводах, основанных на полученных в ходе проведенного исследования результатах и полностью соответствуют 6 поставленным задачам.

Замечания по оформлению диссертации

В целом, диссертация по оформлению и содержанию производит очень хорошее впечатление. Принципиальных замечаний по работе нет. Отдельные стилистические и пунктуационные неточности, опечатки не носят

принципиального характера и не отражаются на общей оценке ее содержания.

В ходе ознакомления с материалом диссертационной работы возникли следующие вопросы:

1. Можно ли полученные в эксперименте *in vitro* данные о влиянии пирувата и лактата на белок-белковые взаимодействия гликопротеинов А, В и антител к ним переносить на условия *in vivo*, поскольку кровь является многокомпонентной средой?
2. Предположение о возможности естественных интермедиатов - регуляторов базовых метаболических путей - влиять на белок-белковые взаимодействия основано на непосредственном или опосредованном механизме?
3. Логичны ли с метаболической точки зрения изменения активности лактатдегидрогеназы при добавлении каждой из малых молекул - оксалоацетата и малата, так как они не являются прямыми субстратами?

Полнота опубликования основных результатов исследования и соответствие автореферата основным положениям диссертации

По теме диссертационного исследования опубликованы 43 научные работы, в том числе 19 статей, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ, 7 статей в международных реферативных базах SCOPUS и Web of Science, получено 3 патента.

Материалы работы представлены на многочисленных тематических и научно-практических конференциях в России и за рубежом (Москва, Казань, Новосибирск, Самара, Тюмень и др., 2011-2020; Венгрия, Будапешт, 2012, Португалия, Лиссабон, 2013, США, North Charleston, 2018).

В хорошо структурированном автореферате последовательно изложены и проиллюстрированы основные положения диссертации, что позволяет объективно оценить работу.

Заключение

Диссертационная работа Колотьевой Наталии Александровны «Малые молекулы – переключатели обмена веществ», является завершённым фундаментальным экспериментальным исследованием, содержащим новые научно обоснованные положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение актуальной задачи по оценке влияния малых молекул на белок-белковые взаимодействия и на некоторые каталитические белки, что имеет существенное значение для теоретической биохимии и потенциальное - для практической биологии и медицины.

По актуальности темы, методическому уровню, новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертация Колотьевой Н.А. 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 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Колотьева Наталия Александровна, заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальности: 03.01.04 - биохимия.

Заведующая кафедрой биологической химии
ФГБОУ ВО «Астраханский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор

Д.М. Никулина

28.04.21

414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121.
Тел. (8512)52-41-43. agma@astranet.ru
Тел. (8512)52-53-20, nikulnadina@yandex.ru



Подписи заверяю:
Учёный секретарь ФГБОУ ВО
«Астраханский государственный
медицинский университет»
Минздрава России,
к.м.н., доцент Кульков В.Н.

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	Никулина Дина Максимовна	1945, Россия	ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой биологической химии	Доктор медицинских наук, 03.01.04 - биохимия	профессор по кафедре биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики	03.01.04 – биохимия, медицинские науки
Общее число цитирований в РИНЦ - 423, Индекс Хирша - 9						

<p>а) Перечень научных публикаций в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах 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>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Complex formation with protamine prolongs the thrombin-inhibiting effect of DNA aptamer in vivo / Spiridonova, V.A., Novikova, T.M., Nikulina, D.M., Dyukareva, O.S., Trizno, N.N. // Biochimie, 2018, 145, с. 158-162. (<i>Scopus, Impact Factor: 3.188, SJR 1.404</i>) 2. Value of the procalcitonin in cardiosurgery practice / Petrova, O.V., Tarasov, D.G., Nikulina, D.M., Kadykova, A.V., Torishneva, E.Yu. // Clinical and Experimental Surgery, 2018, 6 (1), с. 51-61 (<i>Impact Factor 0,294</i>) 3. D-dimer and fibrin-monomer as markers of efficiency of the new oral anticoagulants / Petrova, O.V., Tarasov, D.G., Nikulina, D.M., Zhukova, E.R., Kadykova, A.V. // Clinical and Experimental Surgery, 2018, 6(3), с. 64-69 (<i>Scopus Импакт-фактор 0,164</i>) 4. Is it possible that molecular interactions of the trophoblast-specific beta-glycoprotein could determine its function? 43rd Annual ISOBM Congress 2016 Chicago // Tumor biology. 2016. P. 124. (<i>Scopus, IF - 3.650, SJR 0.84</i>) 5. Fifty years of discovery of alpha-fetoprotein as the first tumor marker. / Nikulina D, Terentyev A, Galimzyanov K, Jurišić V. // Srp Arh Celok Lek. 2015 Jan-Feb;143 (1-2):100-4. (PubMed)
<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</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. D-димер и фибрин-мономер как маркеры эффективности использования новых оральных антикоагулянтов / Петрова О.В., Тарасов Д.Г., Никулина Д.М., Бирюкова Л.А., Мартыанова Ю.Б., Панова Е.В., Мартиросов М.Ю., Грачева Н.П., Жукова Е.Р., Кадыкова А.В. // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского. 2018. Т. 6. № 3 (21). С. 64-69. Импакт-фактор 0,294 2. Никулина Д.М., Сепиашвили Р.И., Спиридонова В.А. ДНК аптамеры: первые результаты и перспективы. Acta Nature спецвыпуск II Объединенный научный форум. Сочи-Дагомыс, Россия, 1-6 октября 2019, 2019. - Т.1. - С.53-54 Импакт-фактор 2,0 3. Изменения гемостазиологического профиля крыс при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа и возможности их коррекции / Тризно Н.Н.,

<p>научных публикаций российских учёных - Российскому индексу научного цитирования (РИНЦ).</p>	<p>Галимзянов Х.М., Никулина Д.М., Спиридонова В.А., Голубкина Е.В., Дюкарева О.С., Тризно М.Н. // Астраханский медицинский журнал. 2017. Т. 12. № 2. С. 75-81. Импакт-фактор 0,520</p> <p>4. Определение функции белков крови с учетом их межмолекулярных взаимодействий / Д.М. Никулина // Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России - Acta naturae – спецвыпуск, том 2, 2016. С .101-102 (Scopus, IF - 2,0, SJR 0.977)</p> <p>5. Оценка диагностической значимости тестов на антенатальные компоненты гемоглобинового спектра / Кривенцев Ю.А., Бисалиева Р.А., Никулина Д.М. // Астраханский медицинский журнал. 2015. Т. 10. № 1. С. 62-68. Импакт-фактор 0,254</p>
<p>г) Рецензируемые монографии по тематике, отвечающей заявленной научной специальности. (Указать выходные данные, тираж).</p>	<p>Alpha-Fetoprotein. Functions and Clinical Applications (Editors: Nisha Lakhi, Michael Moretti). NOVA Science publishers, Inc., New York, 2016, 404 p. / Vladimir Jurisic and Dina Nikulina. Chapter 1. The History of Alpha-Fetoprotein Discovery, P. 4-19.</p>
<p>д) Препринты, размещённые в международных исследовательских сетях.</p>	<p>Biochimie. doi: 10.1016/j.biochi.2017.09.010. Epub 2017 Sep 19. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.12919/pdf</p>

Официальный оппонент:
 заведующая кафедрой биологической химии ФГБОУ ВО
 «Астраханский государственный медицинский университет»
 Министерства здравоохранения Российской Федерации
 доктор медицинских наук, профессор



Д.М. Никулина

16.02.21

Подписи заверяю:
 Учёный секретарь ФГБОУ ВО
 «Астраханский государственный
 медицинский университет»
 Минздрава России,
 к.м.н., доцент Кульков В.Н.