

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

**доктора медицинских наук, профессора,  
заведующего кафедрой биохимии и клинической лабораторной  
диагностики федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Казанский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Мустафина Ильшата Ганиевича  
на диссертационную работу Кузьмичевой Валерии Игоревны на тему  
«Структурно-функциональный потенциал лактата в регуляции  
межмолекулярных взаимодействий», представленную на соискание  
ученой степени кандидата медицинских наук по специальности  
03.01.04 – биохимия**

### **Актуальность темы исследования**

На сегодняшний день в научном сообществе активно разрабатывается вопрос о взаимодействии малых молекул друг с другом и с более крупными молекулами, в частности, с белками. Долгое время данный тип взаимодействий оставался в тени научного интереса, сильно уступая по степени изученности белок-белковым и белок-ДНК/РНК взаимодействиям. Лишь в последнее десятилетие, начиная с 2009 года, отмечается рост числа публикаций, по данным международных реферативных баз, посвященных этой проблеме. Появляются сведения, подтверждающие наличие неметаболических функций у малых молекул: способность изменять экспрессию генов, потоки в путях промежуточного метаболизма, что может приводить к изменению специфических процессов, протекающих во внутри- и межклеточных пространствах.

При выборе белковой мишени для изучения особенностей взаимодействия метаболит-белок особый интерес представляют сигнальные белки, а именно, каталитические, поскольку они проявляют высокую чувствительность к воздействию на них внешними стимулами, такими как эндогенные метаболиты или органические соединения с малой молекулярной массой. Немаловажным является доступность количественной оценки изменений, произошедших под влиянием малых молекул, которые будут находить отражение в показателях функциональной активности.

Направление поиска низкомолекулярных лигандов, способных влиять на структуру и функцию белка представляется актуальной задачей, а использование в качестве таких соединений эндогенных метаболитов, составляющих постоянное микроокружение нашего организма, позволяет говорить о вкладе в развитие такого направления как биоэнергетическая медицина. Познав направленность эффекта и концентрационные зависимости изучаемых лигандов, доступной становится возможность индуцированного воздействия на энергетические внутриклеточные потоки, что может служить ключевым моментом в досимптоматическом выявлении и коррекции патологических состояний.

### **Новизна исследования**

Впервые с применением метода *in silico* в программах PASS и STITCH описан спектр прогнозируемой активности лактата и установлены наиболее вероятные белковые партнеры для изучения межмолекулярных взаимодействий (семейство растворимых белков переносчиков SLC16A, белок-рецептор лактата HCAR1, нейропротективный белок MTRNR2L2, прекурсор амилоидного белка APP).

Впервые получен блок данных, раскрывающий особенности взаимодействия комплексов антиген-антитело на примере антигенов групп крови АВ0, а также естественных и моноклональных антител при внесении в экспериментальную систему лактата. Выявлена разнонаправленность действия лактата на антигены А и В. Разработан способ оценки влияния лактата на аффинитет связи белок-лиганд (патент № 2680408 от 21.02.2019 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на аффинитет белок-лигандной связи»).

Впервые показано протекторное влияние низких концентраций (0,5-2 мкМ) оксалоацетата на конформацию каталитического белка лактатдегидрогеназы, которое проявляется в увеличении термостабильности молекулы белка. Установлено, что оксалоацетат в низких концентрациях увеличивает активность лактатдегидрогеназы в прямой реакции, в более

высоких – оказывает дозозависимое ингибирующее воздействие на каталитическую систему.

### **Практическая значимость и научная ценность**

Представленные диссертантом результаты экспериментов *in silico* являются собой значимую платформу для проведения дальнейших экспериментов по определению интересующих биологических и фармакологических эффектов изучаемого соединения: смоделированная карта белковых взаимодействий позволяет с высокой степенью вероятности выявить потенциального партнера для взаимодействия и изучения.

Установленные в диссертационной работе дозозависимые характеристики влияния низкомолекулярных метаболитов на каталитические белки, включающие изменения в конформационной лабильности, термолабильности и функциональной активности, позволяют сформировать представление о потенциально перспективных с точки зрения разработки лекарственных препаратов концентрациях лигандов малой молекулярной массы.

С практической точки зрения полученные результаты важно учитывать в работе клинико-диагностических лабораторий при постановке таких высокочувствительных методов исследования, как иммуноферментный анализ, иммунохемилюминесцентный анализ. Основой представленных методик является процесс белок-белкового взаимодействия, на эффективность которого могут оказывать влияние изучаемые метаболиты – лактат и оксалоацетат. Для исключения интерферирующего влияния гиперлактатемии при работе с высокотехнологичными лабораторными методами (иммуноферментный, иммунохемилюминесцентный, методы молекулярной диагностики) диссертантом предлагается учитывать содержание лактата у каждого пациента.

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

Работа выполнена на достаточном клиническом и лабораторном материале: проведено обследование 210 клинически здоровых лиц, с определением групповой принадлежности крови по системе АВ0, а также содержания в венозной крови лактата, пирувата и активности лактатдегидрогеназы, определено влияние лактата на процессы белок-белкового взаимодействия с использованием в качестве экспериментальной модели систему групп крови АВ0.

Вторая часть исследования проводилась с использованием чистого белка лактатдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.27) из мышц кролика тип XI (лиофилизат, Sigma Aldrich, США) и оксалоацетата (Sigma Aldrich, США). Работа выполнена с привлечением высокоточного и технологичного оборудования методами микрокапиллярного термофореза и дифференциальной сканирующей флуориметрии.

Для статистической обработки данных диссертантом было привлечено большое количество методов, включая классические подходы с применением методов описательной статистики и межгрупповых сравнений с использованием теста Манна-Уитни, t-критерия Стьюдента, а также нестандартные методики: была разработана математическая модель, позволяющая провести углубленный анализ результатов эксперимента по изучению влияния оксалоацетата на конформационную лабильность каталитического белка.

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 проблемы, 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 и состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы, иллюстрирована 12 таблицами и 47 рисунками. Указатель литературы содержит 342 источника, из которых 41 отечественных и 301 зарубежных авторов.

**Обзор литературы** состоит из трех подразделов, которые посвящены анализу исторических и современных данных о роли лактата в выполнении различных функций, а также методах компьютерного моделирования в определении биологического потенциала низкомолекулярных лигандов. Диссертантом выстроена четкая логическая цепь с момента открытия этого естественного интермедиата, дальнейшего изучения его метаболизма в организме в норме и при различной патологии до анализа современного состояния вопроса, характеризующегося более детальным изучением лигандной роли лактата и функционированием лактатдегидрогеназной каталитической системы.

**Во второй главе** изложены материалы и методы, применяемые в работе. Необходимо отметить широкий методологический портфель, использованный диссертантом для достижения поставленной цели. В главе приводится подробная схема дизайна исследования, позволяющая составить общую картину и проследить логику представленных результатов экспериментальной работы. Диссертантом были применены биохимические, иммуногематологические методики, предложено использование конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для количественной характеристики изучаемого явления, описано использование методов микрокапиллярного термофореза и дифференциальной сканирующей флуориметрии.

**Главы с третьей по пятую** представляют собой собственные данные диссертанта. В изложении материала следует отметить последовательность, аналитический подход и доступность. Каждая из глав посвящена реализации

определенной задачи: в третьей главе представлены результаты компьютерного моделирования в программах PASS и STITCH, показавшие наличие большого количества фармакологических эффектов лактата. В четвертой главе представлены результаты по изучению влияния лактата на белок-белковое взаимодействие. В качестве экспериментальной модели автором предложено использование системы группы крови АВ0, где компонентами взаимодействия являлись гликопротеины А и В с одной стороны и естественные и моноклональные антитела – с другой. Выбор данной системы представляется обоснованным, поскольку доступен, как для визуализации, так и для количественной оценки. Вместе с тем, диссертантом была обоснована необходимость проведения дальнейших экспериментов с применением высокоочищенного монокаталитического белка в качестве которого была выбрана лактатдегидрогеназа (Sigma Aldrich, США). При работе с ферментами использовались высокоточные методики, позволившие получить сведения о разнонаправленном влиянии низкомолекулярных лигандов на конформацию и функциональную активность белковых молекул. В качестве рекомендации: в главе 4. приведена автором работы излишняя информация, не несущая в рамках обсуждения полученных результатов полезной информации или приведены данные общеизвестные, например - рис. 4.3. и информация о структуре иммуноглобулинов, сведения о гибридной технологии. Есть некоторые неточности в описании: - «...антитела приобретают способность ... деления».

**Заключение** диссертации представляет собой развернутое обсуждение полученных результатов исследований и содержит основные положения диссертации, на основании которых автор делает выводы и обосновывает практические рекомендации. Выводы сформулированы в должном соответствии с полученными диссертантом данными на основании их глубокого анализа. Значимость для науки и практики полученных результатов несомненна.

В целом, заключение рассматриваемой диссертационной работы представляет собой последовательное, логически стройное подведение

итогов в связи с целью и задачами, поставленными во введении. Однако, на мой взгляд, в разделе «Заключение» автором работы приведены повторно некоторые данные, представленные в главах собственных результатов исследований, а рисунки и графики лучше предоставить было в этих главах.

### **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 клинико-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.

В ходе ознакомления с рукописью диссертации и авторефератом возникли вопросы:

1. Получены интересные научные данные о возможных биологических эффектах лактата с помощью компьютерного моделирования, но компьютерное моделирование не учитывает всех механизмов влияния других участников метаболических процессов, межклеточных взаимодействий, специализированных регуляторных систем *in vivo*.

Почему Вами выбрана после исследований *in silico* исследование влияния лактата на белок-белковые взаимодействия в системе АВО?

2. По результатам компьютерного моделирования лактат оказывает противоопухолевый эффект. Нет ли противоречия с ситуацией *in vivo*, когда в опухоли преобладают анаэробный гликолиз?
3. Есть ли данные по результатам компьютерного моделирования о влиянии лактата на ЛДГ, антигены АВО?
4. Как можно объяснить разнонаправленный дозозависимый эффект оксалоацетата на стабильность лактатдегидрогеназы ?
5. Визуализация белок-белковых взаимодействий (антитела к антигенам АВО) методом лазерной конфокальной микроскопии насколько объективна? Можно ли по определению площади, занимаемой агрегатами эритроцитов, судить о белок-белковых взаимодействиях? С помощью ЛКМ оценена агглютинация эритроцитов? Или нет? Какова разрешающая способность ЛКМ?

## **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, 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  
и клинической лабораторной диагностики  
федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Казанский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
доктор медицинских наук,  
профессор

Мустафин Ильшат Ганиевич

специальность 14.00.16 – патологическая физиология

Подпись заверяю:  
Ученый секретарь, д.м.н., доцент

О.Р.Радченко



420012, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Булгерова, 49, тел. 8(843)253-60-26  
Ilshat64@mail.ru

27.04.2020

## 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 Д 208.038.02, 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	Мустафин Ильшат Ганиевич	1964, РФ	федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой биохимии и клинической лабораторной диагностики	Доктор медицинских наук, 14.00.16 – патологическая физиология	профессор	03.01.04 –биохимия (медицинские науки)
Общее число цитирований в РИНЦ - 600, Индекс Хирша - 12						
а) Перечень научных публикаций в издания, индексируемых в международных			1. Circulating microparticles alter formation, structure, and properties of fibrin clots /Zubairova L.D.,Nabiullina R.M., Nagaswami Ch., Zuev Yu.F., Mustafm I.G., Litvinov R.E, Weisel J.W. //Scientific Reports. - 2015. - Т. 5. - С. 7611. Импакт-фактор – 4,36.			

<p>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"> <li>2. The off-label use of drugs for parenteral nutrition as a solvent of substances slightly soluble in water in pharmacological research/ Urakov A.L., Mustafin I.G., Samorodov A.V., Kamilov F.Kh., Khaliullin F.A. //Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research. 2018. - Т. 9. - N2 1 . - С.9- 14. Импакт-фактор - 0,54.</li> <li>3. Changes in HLA-DR Expression on Monocytes and Lymphocytes in Neonatal Sepsis/ Khaertynov, K.S., Anokhin, V .A., Mustafin, I.G., Khaertynova, A.K., Sofronova, S.A. //BioNanoScience. -2018.-8(2), с. 647-653. Импакт-фактор – 0,53.</li> <li>4. Inhibition of fibroblast growth factor receptor-signaling sensitizes imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors to low doses of topoisomerase II inhibitors Boichuk, S., Dunaev, P., Galembikova, A., Mustafin, I ., Valeeva, E. //Anti-Cancer Drugs - 2018. - 29(6), с. 549-5. Импакт-фактор – 1 ,869</li> <li>5. Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTS Fatkhutdinova/ L.M., Khaliullin T.O., Vasil'yeva O.L., Zalyalov R.R., Mustafin I.G., Kisin E.R., Yanamala N., Shvedova A.A., Birch M.E. // Toxicology and Applied Pharmacology. –2016. –Т. 299. –С. 125-131. Импакт-фактор – 3,705</li> </ol>
<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"> <li>1. Характеристика циркулирующих иммунных комплексов сыворотки больных атопической бронхиальной астмой разной степени тяжести / Скибо Ю.В., Курмаева Н.Ш., Цибулькина В.Н., Мустафин И.Г., Абрамова З.И. // Казанский медицинский журнал. - 2013. Т. 94. - № 5. Импакт-фактор –0,425.</li> <li>2. Роль эндогенных антимикробных пептидов в развитии воспалительных заболеваний пародонта у пациентов, находящихся на ортодонтическом лечении / Блашкова С.Л., Мустафин И.Г., Халиуллина Г.Р. // Фундаментальные исследования. - 2014. - № 4-3. С. 461-465. Импакт-фактор –0,440.</li> <li>3. Влияние микровезикул крови на кинетику полимеризации и ферментативного гидролиза фибрина /Набиуллина Р.М., Мустафин И.Г., Зуев Ю.Ф., Файзуллин Д.А., Литвинов Р.И., Зубаирова Л.Д. //Доклады Академии наук. –2015. Т–. 462. № 1. –С. 111. Импакт-фактор – 0,539.</li> </ol>

научных публикаций российских учёных - Российскому индексу научного цитирования (РИНЦ).

4. Клеточные микровезикулы связываются с фибрином в процессе свертывания крови/ Набиуллина Р.М., Мустафин И.Г., Литвинов Р.И., Зубаирова Л.Д. //Тромбоз, гемостаз и реология.– 2016. –№ S3 (67). –С. 302-303. Импакт-фактор –0,546
5. Протеомные технологии в разработке новых вакцин на основе серотип-неспецифичных белковых антигенов STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE/ Тюрин Ю.А., Зарипова А.З., Исаева Г.Ш., Мустафин И.Г., Баязитова Л.Т. // II Казанский медицинский журнал. - 2019.-Т. 100, № 4. - С. 680-68. Импакт-фактор – 0,425.
6. Нарушения системы гемостаза как основной патогенетический механизм в возникновении аномальных маточных кровотечений в постменопаузальном периоде / Чечулина О.В., Курманбаев Т.Е., Тухватуллина Л.М., Хайруллина Э.А., Мустафин И.Г. // Казанский медицинский журнал. - 2019. Т. 100. - № 4. - С. 589-594. Импакт-фактор – 0,425.

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой биохимии  
и клинической лабораторной диагностики  
федерального государственного бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования  
«Казанский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
доктор медицинских наук, профессор

Подпись заверяю:  
Ученый секретарь, д.м.н., доцент

27.03.2020

И.Г.Мустафин



О.Р.Радченко