### ОТЗЫВ

председателя диссертационного совета на диссертацию Соболевой Алены Вадимовны на тему: «Сайты гликирования белков плазмы крови как перспективные биомаркеры сахарного диабета второго типа», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

## Актуальность темы исследования

Масштабы распространения сахарного диабета второго типа (СД2) в последние годы становятся угрожающими. Неуклонному росту заболеваемости способствует отсутствие выраженной клинической симптоматики в начале развития патологического процесса и хроническое его течение, которое приводит к поздней диагностике, зачастую уже при появлении серьёзных осложнений. К сожалению, позднее распознавание данного вида патологии делает дальнейшую терапию СД2 менее эффективной и более затратной, а различного рода осложнения и коморбидные состояния приводят к инвалидизации или снижению качества жизни больного и сокращению ее продолжительности. Точное предсказание возникновения заболевания и возможность его ранней диагностики позволит снизить риск серьезного ухудшения здоровья человека. На молекулярном уровне сахарный диабет характеризуется гликированием внутри- и внеклеточных белков. Наличие гликированных белков, представляющих совокупность их неферментативных посттрансляционных модификаций, происходящих при взаимодействии остатков лизина и аргинина с восстанавливающими сахарами и дикарбонильными продуктами их деградации, является одним из наиболее распространенных и надежных маркеров СД2. Гликированный гемоглобин (HbA1c) служит самым распространённым маркером гликирования, а также является общепризнанным непрямым, но адекватным индикатором уровня глюкозы в плазме крови в течение трёх последних месяцев перед анализом. Однако, несмотря на высокую эффективность в качестве маркера долгосрочного гликемического контроля, HbA1c не чувствителен к кратковременным колебаниям уровня глюкозы в крови, сопровождающим начальные этапы развития сахарного диабета. С другой стороны, такой маркер, как гликированный сывороточный альбумин, на сегодняшний день менее исследован, поскольку содержит множество потенциальных сайтов гликирования с неизвестной кинетикой модификации по каждому из таких сайтов. Таким образом, использование биомаркеров нового поколения, представленных отдельными высокореактивными сайтами гликирования белков плазмы крови, даст возможность раннего выявления гипергликемии и СД2 с высокой чувствительностью и специфичностью. Контроль гликемического статуса в течение различных, особенно коротких, периодов времени может повысить возможности раннего выявления СД2. Поэтому тематика предлагаемой к защите работы, несомненно, является актуальной.

### Степень обоснованности научных положений и выводов

Приведенные в рассматриваемом диссертационном исследовании выводы обоснованы, логично следуют из полученных результатов. При выполнении исследования диссертантом были использованы современные, адекватные поставленным целям и задачам, методы. Достоверность полученных данных подтверждается результатами статистической обработки, проведенной с помощью корректных подходов. Работа прошла апробацию на различных уровнях, результаты диссертационного исследования излагались на нескольких международных конференциях, а также были опубликованы в ведущих

рецензируемых журналах, индексируемых базами данных Scopus и Web of Science Core Collection. Две статьи, опубликованные по материалам диссертации, вышли в журнале первого квартиля, а третья — в журнале второго квартиля. В целом, научные положения и выводы в диссертационной работе Соболевой А.В. можно считать корректными и доказанными.

# Оценка научной новизны исследования

было идентифицировано 32 новых гликированных пептида, перспективных качестве биомаркеров СД2. Ha основе этих ранее гликированных идентифицированных пептидов была успешно разработана валидирована диагностическая стратегия, основанная на количественном анализе уровня гликирования по индивидуальным сайтам в белках плазмы. Благодаря вовлечению в анализ нескольких гликированных белков с различными периодами полужизни можно рассмотреть несколько временных сегментов гликемического контроля в рамках одного аналитического эксперимента. Этот подход может существенно повысить эффективность предсказания заболевания, мониторинга его развития и контроля успешности терапии. Более того, при рассмотрении достаточно больших когорт пациентов такой подход представляется эффективным для уменьшения влияния учета отдельных сайтов гликирования на общую дисперсию данных. Применение отдельных биомаркеров дает возможность предсказывать диабет с вероятностью не менее 90 %, тогда как интегрированный маркер обеспечивает чувствительность, точность и специфичность 80, 90 и 100 % соответственно.

Для верификации и валидации предложенной аналитической стратегии был разработан метод абсолютного количественного анализа на основе дважды меченых гликированных пептидов (а именно, содержащих дабсиловую и изотопную метки). Была показана применимость разработанного метода для получения не относительных, а абсолютных показателей количественного анализа индивидуальных сайтов гликирования в белках плазмы крови пациентов с СД2 и здоровых добровольцев с нормогликемией. Использование дважды меченых синтетических гликированных пептидов, добавленных в плазму крови до начала пробоподготовки в качестве внутренних стандартов, позволило нивелировать погрешности, связанные с трипсинолизом, очисткой гидролизатов и ограниченной стабильностью соединений Амадори. Этот результат позволяет заключить, что данный аналитический метод может быть использован для исследования биомаркеров и применения в клинической диагностике.

### Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Теоретическая, а также и практическая значимость работы, обусловлены тем, что полученный диссертантом набор биомаркеров СД2, основанный на учете отдельных участков гликирования белков с разным временем полужизни, позволяет контролировать гликемический статус человека в течение различных периодов времени, что может повысить показатели раннего выявления диабета. Разработанные протоколы анализа гликированных пептидов могут быть внедрены в учебный процесс в ВУЗах медикобиологической направленности в рамках практических курсов по биохимии, патологической физиологии, медицинской химии, биохимической диагностики.

### Оценка содержания диссертации, ее завершенности

Диссертационная работа Соболевой А.В., изложенная на 248 страницах (136 страниц – вариант, написанный на русском языке, и 112 страницы – на английском) включает главы Введение, Цели и задачи, Материалы и методы исследования, Результаты, Обсуждение, Выводы, Список литературы и Приложение. Диссертация проиллюстрирована 15 рисунками, содержит 21 таблицу; список процитированной литературы включает 314 источников, существенную долю составляют статьи, опубликованные за последние 5 лет. Диссертация логически выстроена, разделы работы дополняют друг друга.

Во «Введении» автором обоснована актуальность темы исследования, представлен обзор литературы по данной тематике, состоящий из шести разделов. Рассмотрены молекулярные механизмы, лежащие в основе патогенеза СД2, биохимические реакции, протекающие в ходе раннего и глубокого гликирования белков, их патофизиологическая роль и существующие аналитические подходы для исследования данного процесса. Последний раздел посвящён биомаркерам сахарного диабета второго типа.

В главе «Цели и задачи» четко определена направленность работы, указаны основные цели и задачи, раскрыты научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также представлены основные положения, выносимые на защиту, приведены сведения об апробации результатов работы.

В главе «Материалы и методы исследования» подробно описаны использованные в работе методики. Глава содержит 15 разделов, где изложены различные химические и биохимические методы, детально описаны использовавшиеся в работе реактивы, оборудование, лабораторный пластик и программное обеспечение, а также методы статистической обработки результатов.

Глава «Результаты» состоит из трёх разделов, в которых автор приводит материалы, обосновывающие положения, выдвинутые на защиту. Полученные экспериментальные данные обработаны с помощью адекватных методов математической статистики, достоверность результатов не вызывает сомнений.

В качестве замечания могу отметить, что в таблице 12 в английском и русском вариантах были продублированы первые цифры чисел. Также в таблице 12 в английском варианте продублированы первые буквы слов в заголовках столбцов.

Глава «Обсуждение» содержит четыре раздела, в которых автор сопоставляет полученные результаты с имеющимися в литературе сведениями.

«Выводы» обоснованы и корректны, соответствуют поставленным задачам.

Работа является завершенным научным исследованием и, в целом, производит благоприятное впечатление.

К числу критических замечаний можно отнести наличие опечаток, неудачных стилистических оборотов, небольших недочетов. В качестве примера привожу фразу на странице 123 раздела «Введение» (русскоязычный вариант): "Предполагается, что определенный вклад в широкую распространенность СД в человеческой популяции и его негативную динамику могут вносить такие факторы, как неуклонно увеличивающаяся выживаемость пациентов, непрерывное улучшение качества лечения заболевания, снижение преждевременной смертности, увеличение калорийности рациона и связанное с этим увеличение числа молодых взрослых с СД2 могут [9]." Фраза не закончена. Кроме того, мне кажется, что такие параметры, как «улучшение качества лечения» и «снижение смертности» не следует указывать в числе основных причин негативной динамики СД2, а имеет смысл на первое место поставить нарушение режима питания - злоупотребление отдельными продуктами, генетическую предрасположенность и т.п. При этом, в

англоязычном варианте фраза изложена совершенно корректно, никаких претензий нет. Еще один пример - также из Введения: в первом абзаце раздела 2.2. главы «Ведение» (стр. 10) варианта на английском языке написано: «Proteins represent the principal effector molecules in living cells...». С этим утверждением можно поспорить, так как белки имеют многообразные функции, это не только эффекторные молекулы. При этом, в русскоязычном варианте текста та же фраза (стр. 124) звучит по-другому: "Белки представляют собой основные регуляторные молекулы живых клеток". То есть имеет место некоторое несоответствие, причем два варианта вполне дополнили бы друг друга.

Имеются и другие мелкие недочеты, которые не влияют на положительную оценку диссертационной работы Соболевой А.В.

Таким образом, можно сделать заключение, что диссертация Соболевой А.В. является научно-квалификационной работой в области биохимии, в которой содержится решение научной задачи, связанной с поиском биомаркеров сахарного диабета второго типа. В целом, полученные данные стероидов. В целом, полученные данные вносят вклад в развитие фундаментальных представлений о молекулярных механизмах патогенеза сахарного диабета второго типа и могут быть использованы в медико-биологических исследованиях, направленных на поиск путей ранней диагностики диабета.

## Вопросы:

- 1. Как было упомянуто в тексте диссертации, сывороточный альбумин человека имеет 59 остатков лизина, но из них, по мнению автора, свойствами биомаркеров обладают только остатки лизина в 25 сайтах. Может ли это быть связано со стерической доступностью сайтов гликирования в молекуле альбумина?
- 2. Вопрос об абсолютном количественном определении отдельных участков гликирования: является ли данный метод впервые разработанным Вами для этой цели? Если да, то обрисуйте, пожалуйста, состояние этой проблемы на сегодняшний день? Если это не новый метод, позволяющий получить абсолютные, а не относительные данные количественного анализа определения сайтов гликирования пептидов, то каковы его преимущества по сравнению с уже имеющимися подходами?

Заключение. Диссертация Соболевой Алены Вадимовны на тему: «Сайты гликирования белков плазмы крови как перспективные биомаркеры сахарного диабета второго типа», соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Соболева Алена Вадимовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия. Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушены.

luar

Председатель доктор биологических наук, член-корреспондент РАН профессор кафедры биохимии Биологического факультета СПбГУ

Шамова О.В.