

ОТЗЫВ

члена 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 научной специальности

1.5.4. Биохимия

1. . Актуальность выполненного исследования

Сахарный диабет является социально значимым заболеванием. Согласно данным ВОЗ, около полумиллиарда человек страдает от этого заболевания. Считается, что ранняя диагностика СД2 позволит значительно снизить риск возникновения осложнений и обойтись гораздо менее радикальными методами лечения, такими как диета, с минимизацией использования лекарств. В работе поставлена цель по поиску новых белковых маркеров сахарного диабета 2 типа для ранней диагностики заболевания. Поэтому, поставленные задачи несомненно являются актуальными.

2. Новизна исследования и полученных результатов, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

- С использованием протеомных подходов автором впервые определены белки, для которых экспериментально показаны сайты гликирования.
- Разработана новая методика определения наиболее информативных в диагностике пептидов на основе внутренних стандартов с включением изотопно-меченых аминокислот и сахаров и методов таргетной масс-спектрометрии.
- Впервые была проведена валидация разработанных методов на плазме больных и здоровых добровольцев.
- Впервые определены такие характеристики статистические показатели диагностического теста как чувствительность и специфичность.

3. Значимость для науки и практики результатов диссертации, возможные конкретные пути их использования

Изучение посттрансляционных модификаций белков является важной фундаментальной задачей в современных исследованиях. Для изучения, автором диссертации выбран определенный тип посттрансляционных модификаций – неферментативная реакция свободных аминогрупп белков с восстанавливающими сахарами. Роль и значимость данных реакций в организме человека практически не изучена, поэтому выявление белков, модифицированных сахарами, и взаимосвязь этих изменений с социально значимыми заболеваниями, является важным как для пополнения фундаментальных знаний, так и в практическом плане. Кроме того, разработанная методика имеет перспективы применения в качестве диагностического теста для выявления ранних стадий сахарного диабета 2 типа.

Достоверность научных положений и выводов основывается на достаточном объеме и количестве источников, использовании независимых инструментальных методов и статистической обработке полученных результатов.

4. Соответствие паспорту специальности

Работа соответствует паспорту специальности «1.5.4. Биохимия» по пунктам 1 – «Проблемы строения, свойств и функционирования отдельных молекул и надмолекулярных комплексов в биологических объектах, изучение молекулярной организации структурных компонентов, выяснение путей метаболизма и их взаимосвязей.»; 10 – «Теоретические и прикладные проблемы природы и закономерностей химических превращений в живых организмах, молекулярных механизмов интеграции клеточного метаболизма, связей биохимических процессов с деятельностью органов и тканей, с жизнедеятельностью организма для решения задач сохранения здоровья человека, животных и растений, выяснения причин различных болезней и изыскания путей их эффективного лечения. Развитие методов генодиагностики, энзимодиагностики и научных принципов генотерапии и энзимотерапии»; 17 – «Физические, химические, технические и экологические основы выделения, синтеза и наработки веществ, присущих живым организмам для решения определенных медицинских, сельскохозяйственных, ветеринарных, технических и технологических задач.».

5. Оценка содержания диссертации

Диссертация Соболевой А.В. представлена в виде рукописи на английском и русском языках и состоит из введения, которое по сути является обзором литературы, и следующих разделов: цель и задачи исследования, материалы и методы, результаты, обсуждение и заключение. Отдельно в приложении представлены некоторые экспериментальные данные. Всего диссертация состоит из 122 страниц и содержит 15 рисунков и 21 таблицу. В списке литературы представлено 314 ссылок на научные работы.

В введении рассмотрены вопросы этиологии, основные проблемы диагностики сахарного диабета. Также представлен литературный обзор и характеристика посттрансляционных модификаций белков. Особое внимание в обзоре уделено процессам гликирования белковых молекул, представлена информация о механизмах химических реакций гликирования белков и методах анализа этих ПТМ, применении масс-спектрометрии для анализа терапевтических белков, а также направлении ее дальнейшего развития, и сформулирована концепция работы.

В разделе «Цель и задачи исследования» аргументирована актуальность, определены цель и задачи исследования, показана научная и практическая значимость работы.

В Главе 4 описаны оборудование, материалы и методики анализа объектов исследования.

В главе 5, посвященной результатам исследования, содержится описание основных результатов исследования. В каждой из наиболее важных частей в начале раздела представлена общая схема экспериментальных работ, что значительно упрощает дальнейший анализ и восприятие полученных результатов. В разделе описан протеомный подход, который использовался для поиска и идентификации сайтов гликирования белков. Подход включает достаточно интенсивную схему пробоподготовки, которая заключается в обогащении фракции гликовидных пептидов и их дальнейшем масс-спектрометрическом анализе. На основании этих данных было получено 24 пептида, в которых обнаружено гликовидование лизинов. Технология количественного анализа без использования изотопно-меченых стандартов позволила выявить наиболее перспективные пептидные кандидаты для последующего анализа

когорт сывороток больных и здоровых добровольцев таргетным масс-спектрометрическим методом. И, наконец, был проведен абсолютный количественный анализ пептидов образцов с добавлением внутренних стандартов, меченых стабильными изотопами, и по результатам измерения проведена валидация метода определения абсолютных концентраций белков и определены основные параметры точности данного теста.

В главе **обсуждение результатов** критически рассматриваются научные и практические перспективы использования идентифицированных маркеров в сравнении с данными других исследователей.

По теме диссертации опубликованы десять работ в зарубежных рецензируемых журналах и глава в книге. Также результаты диссертационной работы были представлены на семи международных конференциях.

Работа является законченной, а содержание и выводы соответствует сформулированным цели и задачам.

При общей положительной оценке работы к ней имеется ряд замечаний и рекомендаций:

1. Когорта пациентов с подтвержденным сахарным диабетом второго типа и здоровых доноров состоит исключительно из женщин. Если это является осознанным выбором, то в диссертации должны быть представлены обоснования такого выбора.

2. Не совсем понятен алгоритм поиска и подтверждения аминокислотных последовательностей гликированных пептидов. В работе сначала проведен поиск гликированных пептидов на основании m/z (Q-TOF), полученных из литературных данных (Фролов и др.), а затем последовательность этих пептидов подтверждается на другом приборе, в отдельном эксперименте с использованием MC/MC (Elite). Разнесение процессов поиска, идентификации и количественной оценки пептидов может внести ошибку в результаты.

3. При оценке эффективности разработанного теста автор использует понятия «чувствительность и точность», в то время как общепринятыми показателями являются чувствительность и специфичность.

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 наук по научной специальности 1.5.4. Биохимия Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не установлены.

Член диссертационного совета
Д.б.н, проф.РАН, зав.лаб.
17.03.23



Згода Виктор Гаврилович

Подпись Згода В.Г.
заверяю 
Ученый секретарь ИБМХ к.х.н. Карпова Е.А.

